Série de la Protection de l'environnement

Méthode d'essai biologique :

essai de reproduction et de survie sur le cladocère *Ceriodaphnia dubia*

Rapport SPE 1/RM/21
Février 1992

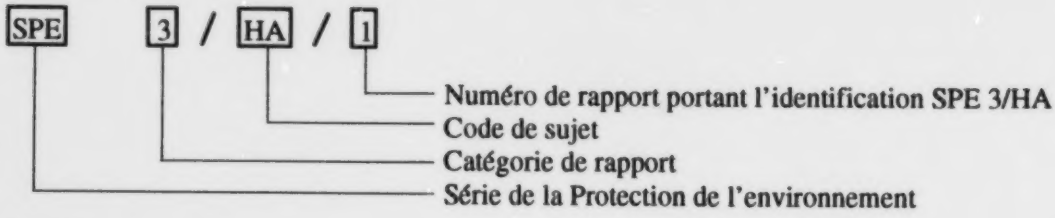
Canada

Environnement Canada Environment Canada

92-04310/

SÉRIE DE LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT

Exemple de numérotation :



Catégories

1 Règlements/Lignes directrices/ Codes de pratiques
2 Évaluation des problèmes et options de contrôle
3 Recherche et développement technologique
4 Revues de la documentation
5 Inventaires, examens et enquêtes
6 Évaluations des impacts sociaux, économiques et environnementaux
7 Surveillance
8 Propositions, analyses et énoncés de principes généraux
9 Guides

Sujets

AG Agriculture
AN Technologie anaérobie
AP Polluants atmosphériques
AT Toxicité aquatique
CC Produits chimiques commerciaux
CE Consommateurs et environnement
CI Industries chimiques
FA Activités fédérales
FP Traitement des aliments
HA Déchets dangereux
IC Chimie inorganique
MA Pollution marine
MM Exploitation minière et traitement des minéraux
NR Régions du Nord et rurales
PF Papier et fibres
PG Production d'électricité
PN Pétrole et gaz naturel
RA Réfrigération et climatisation
RM Méthodes de référence
SF Traitements de surface
SP Déversements de pétrole et de produits chimiques
SRM Méthodes de référence normalisées
TS Systèmes de transport
TX Textiles
UP Pollution urbaine
WP Protection/préservation du bois

Des sujets et des codes additionnels sont ajoutés au besoin. On peut obtenir une liste des publications de la SPE en s'adressant aux Publications de la Protection de l'environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0H3.

Printed on recycled paper

Imprimé sur du papier recyclé

Méthode d'essai biologique : essai de reproduction et de survie sur le cladocère *Ceriodaphnia dubia*

Protection de l'environnement
Conservation et Protection
Environnement Canada

Rapport SPE 1/RM/21
Février 1992

Données de catalogage avant publication (Canada)

Vedette principale au titre:

Méthode d'essai biologique. Essai de reproduction
et de survie sur le cladocère *Ceriodaphnia dubia*

(Rapport ; SPE 1/RM/21)
Publ. aussi en anglais sous le titre: Biological
test method, test of reproduction and survival
using the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*.
Comprend un résumé en anglais.
Comprend des références bibliographiques.
ISBN 0-662-97302-X
No. de cat. MAS En49-24/1-21F

1. Cladocères -- Toxicologie -- Essais -- Normes --
Canada. 2. Effluents -- Qualité -- Essais --
Normes -- Canada. 3. Environnement -- Surveillance --
Canada. I. Canada. Direction générale de la protection
de l'environnement. II. Canada. Environnement Canada.
III. Coll.: Rapport (Canada. Environnement Canada) ;
SPE 1/RM/21.

QL444.B83B6614 1992 595.3'2 C92-099585-3

©Ministre des Approvisionnements et Services Canada 1992
N° de cat. En 49-24/1-21F
ISBN 0-662-97302-X

Commentaires

Pour formuler des commentaires sur la teneur du présent rapport, s'adresser à :

M. Gary Sergy
Direction du développement technologique
Environnement Canada
4999, 98^{e} avenue, pièce 210
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

M. Richard Scroggins
Direction des programmes industriels
Environnement Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

This report is also available in English under the title *Biological Test Method: Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran* Ceriodaphnia dubia. For copies, please contact:

Environmental Protection Publications
Conservation and Protection
Environment Canada
Ottawa, Ontario
K1A 0H3

Résumé

Le présent document expose les méthodes recommandées par Environnement Canada pour l'exécution d'essais de toxicité chronique sur trois couvées du cladocère d'eau douce Ceriodaphnia dubia.

Il présente les conditions et méthodes générales ou universelles permettant de réaliser cet essai de toxicité chronique avec un large éventail de substances. Il précise d'autres conditions et méthodes propres à l'évaluation d'échantillons de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats ou de milieux récepteurs. Le lecteur y trouvera des instructions sur les conditions et les règles d'élevage, la préparation des aliments, la manipulation et le stockage des échantillons, les installations d'essai requises, les méthodes de préparation des solutions d'essai et de mise en route des essais, les conditions prescrites pour les essais, les observations et mesures appropriées, les résultats des essais, les méthodes de calcul et l'utilisation de produits toxiques de référence.

Abstract

Methods recommended by Environment Canada for performing chronic three-brood toxicity tests with the freshwater cladoceran, Ceriodaphnia dubia, *are described in this report.*

General or universal conditions and procedures are outlined for undertaking this chronic toxicity test using a variety of test materials. Additional conditions and procedures are stipulated which are specific for assessing samples of chemicals, effluents, elutriates, leachates, or receiving waters. Included are instructions on culturing conditions and requirements, food preparation, sample handling and storage, test facility requirements, procedures for preparing test solutions and test initiation, specified test conditions, appropriate observations and measurements, endpoints, methods of calculation, and the use of reference toxicants.

Avant-propos

Le présent document fait partie d'une série de ***méthodes recommandées*** *pour mesurer et évaluer les effets bioaquatiques de substances toxiques. Ces méthodes ont été évaluées par Conservation et Protection et sont recommandées pour les applications suivantes :*

- *utilisation dans les laboratoires de toxicité aquatique de Conservation et Protection;*
- *essais confiés à des entrepreneurs par Environnement Canada ou demandés à des organismes ou à des entreprises de l'extérieur;*
- *remplacement d'instructions plus précises, comme celles prévues dans des règlements; et*
- *fondement pour l'établissement d'instructions très explicites devant figurer, en certaines circonstances, dans un protocole réglementaire ou une méthode de référence normalisée.*

Les différents types d'essais compris dans cette série ont été choisis parce qu'ils étaient acceptables aux fins des programmes de protection et de gestion de l'environnement mis en oeuvre par Environnement Canada. Ces documents visent à fournir des lignes directrices et à faciliter l'utilisation de méthodes cohérentes, pertinentes et exhaustives pour recueillir des données sur les effets toxiques d'échantillons de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats, de milieux récepteurs ou, le cas échéant, de sédiments.

Dans le présent document, la mention d'appellations commerciales ne constitue nullement une recommandation de la part d'Environnement Canada; d'autres produits de valeur semblable peuvent être utilisés.

Table des matières

Résumé v
Abstract vi
Avant-propos vii
Liste des figures xii
Liste des tableaux xii
Liste des abréviations et des formules chimiques xiii
Glossaire xv
Remerciements xxiii

Section 1
Introduction 1
1.1 Contexte 1
1.2 Description de l'espèce et utilisation antérieure pour des essais 1

Section 2
Organismes soumis à l'essai 5
2.1 Espèce 5
2.2 Stade du cycle biologique 5
2.3 Source 5
2.4 Élevage 7
2.4.1 Généralités 7
2.4.2 Installations et appareillage 9
2.4.3 Éclairage 9
2.4.4 Milieu d'élevage 10
2.4.5 Température 11
2.4.6 Oxygène dissous 11
2.4.7 pH 12
2.4.8 Dureté 12
2.4.9 Alimentation 12
2.4.10 Manipulation des organismes 14
2.4.11 Critères de santé 14

Section 3
Système d'essai 15
3.1 Installations et appareillage 15
3.2 Éclairage 15
3.3 Récipients d'essai 15
3.4 Eau de contrôle/de dilution 15

Section 4
Méthodes d'essai universelles 17
4.1 Préparation des solutions d'essai 17
4.2 Mise en route de l'essai 21

4.3 Renouvellement des solutions d'essai **23**
4.4 Conditions de l'essai **23**
4.4.1 Oxygène dissous **24**
4.4.2 pH **24**
4.5 Observations et mesures **25**
4.6 Résultats et calculs **26**
4.7 Produits toxiques de référence **30**
4.8 Considérations juridiques **32**

Section 5
Méthodes particulières pour l'essai de produits chimiques **33**
5.1 Propriétés, étiquetage et stockage des échantillons . . **33**
5.2 Préparation des solutions d'essai **33**
5.3 Eau de contrôle/de dilution **34**
5.4 Observations et mesures **36**
5.5 Résultats et calculs **36**

Section 6
Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons d'effluents, d'élutriats et de lixiviats **37**
6.1 Prélèvement, étiquetage, transport et stockage des échantillons **37**
6.2 Préparation des solutions d'essai **38**
6.3 Eau de contrôle/de dilution **39**
6.4 Conditions de l'essai **39**
6.5 Observations et mesures **40**
6.6 Résultats et calculs **40**

Section 7
Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons de milieux récepteurs **42**
7.1 Prélèvement, étiquetage, transport et stockage des échantillons **42**
7.2 Préparation des solutions d'essai **42**
7.3 Eau de contrôle/de dilution **42**
7.4 Observations et mesures **43**
7.5 Résultats et calculs **43**

Section 8
Procès-verbal de l'essai **44**
8.1 Substance à expérimenter **44**
8.2 Organismes soumis à l'essai **44**
8.3 Installations et appareillage **45**
8.4 Eau de contrôle/de dilution **45**
8.5 Méthode d'essai **45**
8.6 Conditions de l'essai **46**
8.7 Résultats de l'essai **46**

Références 47

Annexe A
Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique 55

Annexe B
Adresses de l'Administration centrale et des bureaux régionaux de Conservation et Protection 57

Annexe C
Écarts de méthodologie pour l'exécution d'essais de toxicité chronique sur *Ceriodaphnia* spp. 59

Annexe D
Méthode de préparation de l'YCT et de la nourriture à base d'algues pour les élevages de *C. dubia* 67

Annexe E
Série logarithmique de concentrations convenant aux essais de toxicité 73

Annexe F
Analyse de la mortalité en vue de l'estimation de la concentration létale 50 75

Liste des tableaux

1 Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées pour l'élevage de *Ceriodaphnia dubia* 8

2 Préparation d'eau reconstituée d'une dureté particulière 13

3 Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées pour les essais de toxicité chronique sur trois couvées de *Ceriodaphnia dubia* 18

Liste des figures

1 Schéma de la démarche adoptée pour définir les conditions et méthodes d'essai adaptées à différents types de substances 2

2 Anatomie de la *Ceriodaphnia dubia* femelle 6

Liste des abréviations et des formules chimiques

°C . . . . . degré Celsius

$CaCO_3$ . . . . . carbonate de calcium

$CaSO_4$ . . . . . sulfate de calcium

CI_p . . . . . concentration inhibitrice pour un pourcentage d'effet donné

CL . . . . . concentration létale

CL_{50} . . . . . concentration létale 50

cm . . . . . centimètre

CMEO . . . . . concentration minimale avec effet observé

CSE . . . . . concentration seuil d'effet

CSEO . . . . . concentration sans effet observé

d . . . . . jour

g . . . . . gramme

g/kg . . . . . gramme par kilogramme

h . . . . . heure

HCl . . . . . acide chlorhydrique

H_2O . . . . . eau

KCl . . . . . chlorure de potassium

L . . . . . litre

m . . . . . mètre

MC . . . . . marque de commerce

mg . . . . . milligramme

$MgSO_4$ . . . . . sulfate de magnésium

min . . . . . minute

mL . . . . . millilitre

mm . . . . . millimètre

mS . . . . . millisiemens

N . . . . . normal

$NaHCO_3$ . . . . . bicarbonate de sodium

NaOH . . . . . hydroxyde de sodium

OD . . . . . oxygène dissous (concentration)

P . . . . . probabilité

sp. . . . . espèce

TL_{50} . . . . . temps létal 50

YCT . . . . . moulée de levure, de Cerophyll^{MC} et de truite (Yeast, Cerophyll^{MC}, Trout)

µg . . . . . microgramme

µm . . . . . micromètre

> . . . . . supérieur à

< . . . . . inférieur à

≥ . . . . . supérieur ou égal à

≤ . . . . . inférieur ou égal à

± . . . . . plus ou moins

% . . . . . pour cent

‰ . . . . . pour mille

Glossaire

Remarque : Toutes les définitions ci-après s'appliquent aux méthodes énoncées dans le présent rapport; il se pourrait qu'elles ne soient pas adaptées à d'autres contextes.

Verbes auxiliaires

L'auxiliaire *doit* (*doivent*) est utilisé pour exprimer une obligation absolue.

L'auxiliaire *devrait* (*devraient*) et le conditionnel d'obligation (*il faudrait*, etc.) sont utilisés pour indiquer que la condition ou la méthode en cause est recommandée et doit être respectée dans la mesure du possible.

L'auxiliaire *peut* (*peuvent*) indique qu'on est autorisé à faire une chose ou en mesure de la faire.

Termes techniques généraux

Acclimatation - Adaptation physiologique à un niveau précis d'une ou de plusieurs variables environnementales, par exemple la température. Ce terme s'applique généralement à des conditions contrôlées en laboratoire.

Conductivité - Expression numérique de la capacité d'une solution aqueuse de transporter un courant électrique. Cette capacité dépend de la concentration, de la valence et de la mobilité des ions en solution, ainsi que de la température de la solution. La conductivité s'exprime normalement en millisiemens par mètre (unité SI), ou en micromhos par centimètre (1 mS/m = 10 µmho/cm).

Conformité - Fait de respecter les exigences du gouvernement en matière de réglementation ou de délivrance de permis.

Couvée - Groupe de descendants issus d'une femelle dans l'intervalle compris entre deux mues, soit avant que la carapace ne soit rejetée au moment de la mue.

Daphnie - Invertébré microcrustacé d'eau douce (cladocère de la famille des daphniidés), communément appelé puce d'eau. *Ceriodaphnia dubia, Daphnia magna* et *Daphnia pulex* sont des espèces de daphnies.

Daphnie de première génération - Organisme introduit dans une solution au début d'un essai.

Dispersant - Substance chimique qui réduit la tension superficielle entre l'eau et une substance hydrophobe (p. ex., du pétrole), ce qui facilite la dispersion de cette substance dans l'eau sous forme d'émulsion.

Dureté - Concentration, dans l'eau, de cations réagissant avec une solution savonneuse de sodium pour entraîner la précipitation d'un résidu insoluble. En règle générale, la dureté correspond à la concentration d'ions de calcium et de magnésium dans l'eau et s'exprime en mg/L de carbonate de calcium ou l'équivalent.

Élevage - Ensemble des animaux qu'on élève dans des conditions définies et contrôlées afin d'obtenir des organismes sains en vue d'essais. Activité visant à obtenir ces ensembles.

Élevage en nombre - Élevage constitué de nombreux sujets (normalement 40 ou 50) et de leur descendance. Des néonates issus d'élevages en nombre servent de sources d'organismes pour des élevages individuels.

Élevage individuel - Élevage de néonates créé à partir d'organismes isolés qui sont élevés dans des bechers ou des gobelets. Des néonates issus de génitrices individuelles servent aux essais de toxicité.

Émulsifiant - Substance chimique qui facilite le mélange fin (sous forme de minuscules gouttelettes), dans l'eau, d'une substance normalement hydrophobe.

Éphippie - Sac ovigère qui se forme sous la partie postéro-dorsale de la carapace de la daphnie femelle adulte, dans des conditions d'élevage difficiles (p. ex., surpeuplement, renouvellement peu fréquent de l'eau, alimentation inadéquate, basse température, photopériode réduite). Les oeufs qui s'y trouvent sont normalement fertilisés.

Floculation - Formation d'un précipité léger en suspension (floc) dans une solution.

Lux - Unité SI d'éclairement, mesurant l'intensité lumineuse par mètre carré. 1 lux = 0,0929 pied-bougie; 1 pied-bougie = 10,76 lux.

Néonate - Sujet né ou éclos depuis peu (daphnie au premier stade larvaire, âgée de 24 h ou moins).

pH - Logarithme négatif de l'activité des ions d'hydrogène, mesurée par leur concentration en moles par litre. Cette valeur exprime le degré ou l'intensité des réactions acides et alcalines selon une échelle de 0 à 14, où le nombre 7 représente la neutralité et les nombres inférieurs correspondent, en ordre décroissant, à des réactions acides de plus en plus fortes; les chiffres supérieurs à 7 indiquent, en ordre croissant, des réactions basiques ou alcalines de plus en plus fortes.

Photopériode - Durée d'éclairage et d'obscurité au cours d'un cycle de 24 h.

Pourcentage (%) - Concentration exprimée en parties par centaine. Un pour cent représente une unité ou partie d'une substance (p. ex., effluent, élutriat, lixiviat ou milieu récepteur) diluée dans de l'eau jusqu'à concurrence de 100 parties. On peut préparer des concentrations en volume (*V/V*), en masse (*m/m*) ou, de manière moins précise, en masse par volume (*m/V*). On les exprime en pourcentage de la substance à expérimenter dans la solution finale.

Précipitation - Formation d'un solide (précipité) à partir d'une solution.

Prétraitement - Dans le présent rapport, traitement d'un échantillon ou de sa dilution avant l'exposition des daphnies.

Salinité - Quantité totale, en grammes, de solides dissous dans 1 kg d'eau de mer. Elle se détermine après conversion de tous les carbonates en oxydes, après remplacement de tous les bromures et iodures par des chlorures et après oxydation de toutes les matières organiques. La salinité peut aussi se mesurer directement grâce à un salinimètre/conductimètre ou par d'autres moyens (APHA *et al.*, 1989). Elle s'exprime habituellement en grammes par kilogramme (g/kg) ou en parties par millier (‰).

Surveillance - Activités de vérification de la qualité ou de collecte et de communication de données, effectuées de façon régulière (p. ex., quotidienne, hebdomadaire, mensuelle ou trimestrielle). Dans le contexte du présent rapport, ce terme s'applique soit à la vérification et à la mesure périodiques de certaines variables biologiques ou relatives à la qualité de l'eau, soit au prélèvement et à l'essai d'échantillons d'effluents, d'élutriats,

de lixiviats ou de milieux récepteurs pour la mesure de leur toxicité.

Turbidité - Degré de réduction de la clarté de l'eau par la présence de matières en suspension ou autres qui entraînent la diffusion et l'absorption de la lumière, plutôt que sa transmission en ligne droite dans l'échantillon. La turbidité s'exprime généralement en unités de turbidité néphélométrique.

Termes désignant les substances servant aux essais

Contrôle - Traitement reproduisant l'ensemble des conditions et facteurs qui pourraient influencer les résultats d'une enquête ou d'une étude, à l'exception de la condition particulière faisant l'objet de cette étude. Dans un essai de toxicité aquatique, le contrôle doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, sans porter sur la substance à expérimenter. Le contrôle est utilisé pour établir l'absence de toxicité mesurable en raison des conditions de base de l'essai (p. ex., qualité de l'eau de dilution, santé ou manipulation des organismes soumis à l'essai).

Eau d'amont - Eau de surface (p. ex., d'un ruisseau, d'une rivière ou d'un lac) qui n'est pas soumise à l'influence d'un effluent (ou d'une autre substance à expérimenter), du fait qu'elle se trouve contre le courant ou assez loin perpendiculairement à celui-ci.

Eau de contrôle/de dilution - Eau utilisée pour le contrôle, pour diluer la substance à expérimenter ou pour l'une et l'autre de ces fins.

Eau de dilution - Eau utilisée pour diluer la substance à expérimenter afin d'en préparer différentes concentrations en vue des divers traitements prévus dans le cadre des essais de toxicité.

Eau déchlorée - Eau chlorée (généralement, eau potable municipale) qu'on a traitée afin d'en éliminer le chlore et ses composés.

Eau désionisée - Eau qu'on a purifiée pour en extraire les ions en la faisant circuler dans des colonnes de résine ou dans un système d'osmose inverse.

Eau distillée - Eau qu'on a traitée au moyen d'un appareil de distillation (au verre borosilicaté ou autre) pour en éliminer les impuretés.

Eau reconstituée - Eau désionisée ou distillée au verre à laquelle des produits chimiques de qualité «réactif» ont été ajoutés. L'eau douce synthétique qui en résulte est exempte de contaminants et possède le pH et la dureté souhaités.

Eaux usées - Terme général englobant les effluents, les lixiviats et les élutriats.

Effluent - Tout déchet liquide (p. ex., industriel ou urbain) rejeté dans l'environnement aquatique.

Élutriat - Solution aqueuse obtenue après avoir ajouté de l'eau à une substance solide (p. ex., sédiments stériles ou boues de forage ou de dragage), avoir agité le mélange, puis l'avoir centrifugé ou filtré ou avoir décanté le surnageant.

Lixiviat - Eau ou eau usée ayant traversé une colonne de sol ou de déchets solides dans l'environnement.

Milieu d'élevage - Eau servant à l'élevage de *C. dubia*.

Milieu récepteur - Eau de surface (p. ex., d'un ruisseau, d'une rivière ou d'un lac) qui a reçu un rejet de déchet ou qui est sur le point d'en recevoir un (p. ex., immédiatement en amont du point de rejet). D'autres termes doivent être employés afin de préciser lequel de ces deux sens s'applique dans le contexte.

Produit chimique - Dans le présent rapport, se dit de tout élément, composé, formule ou mélange de substances chimiques qui pourrait se retrouver dans l'environnement aquatique par déversement, application ou rejet. Les insecticides, les herbicides, les fongicides, les larvicides employés contre la lamproie marine et les agents de traitement des déversements de pétrole sont des exemples de produits chimiques qui se retrouvent dans l'environnement.

Produit toxique de référence - Produit chimique étalon utilisé pour mesurer la sensibilité des organismes soumis à l'essai afin d'établir les limites de confiance des données de toxicité recueillies sur une substance à expérimenter. Dans la plupart des cas, on procède à un essai de toxicité sur un produit toxique de référence afin d'évaluer la sensibilité des organismes au moment de l'étude d'une substance à expérimenter, ainsi que la précision des résultats obtenus par le laboratoire pour ce produit.

Solution mère - Solution aqueuse concentrée de la substance à expérimenter. Des volumes mesurés de la solution mère sont

ajoutés à l'eau de dilution afin de préparer les solutions d'essai aux concentrations requises.

Termes de toxicologie

Aigu - Qui a lieu dans un bref intervalle (de quelques secondes, minutes, heures ou jours) par rapport à la durée de la vie de l'organisme soumis à l'essai.

Chronique - Qui a lieu dans un intervalle d'exposition relativement prolongé correspondant généralement à une partie importante de la durée de la vie de l'organisme, par exemple, 10 % ou plus. Dans le cas des essais sur des cladocères, ce terme s'applique généralement à l'intervalle requis pour l'obtention de trois couvées.

CI_p - Concentration inhibitrice pour un pourcentage d'effet donné. Il s'agit d'une estimation ponctuelle de la concentration à laquelle la substance à expérimenter provoque une réduction donnée d'une fonction biologique de caractère quantitatif, comme la reproduction. Par exemple, une CI_{25} pourrait être la concentration qui causerait une réduction de 25 % du nombre moyen de jeunes produits par des daphnies, par rapport au nombre produit par des organismes témoins. Cette expression devrait être appliquée à tout essai toxicologique qui sert à mesurer la variation d'une mesure relative, comme le taux de reproduction, la vitesse de croissance ou la fréquence respiratoire. (L'expression CE_{50}, ou concentration efficace 50, ne s'emploie que pour des mesures absolues, comme le nombre de sujets chez lesquels on observe un effet particulier.)

CL_{50} - Concentration létale 50 (ou médiane). Il s'agit de la concentration d'une substance dans l'eau qu'on estime létale pour 50 % des organismes soumis à l'essai. La CL_{50} et ses limites de confiance à 95 % sont généralement obtenues par analyse statistique de la mortalité à plusieurs concentrations d'essai, après une durée d'exposition donnée. Cette durée doit être précisée (p. ex., CL_{50} après sept jours).

CMEO - Concentration minimale avec effet observé. Il s'agit de la plus faible concentration d'une substance à expérimenter qui, lorsque des organismes y sont exposés, provoque chez eux des effets nocifs qui sont détectés par l'observateur et sont statistiquement significatifs. Par exemple, la CMEO pourrait être la plus faible concentration à laquelle le nombre de sujets vivants produits par des daphnies adultes diffère

significativement du nombre de sujets produits par des organismes témoins.

CSE - Concentration seuil d'effet. Il s'agit de la moyenne géométrique de la CSEO et de la CMEO. «Seuil de toxicité chronique» ou «seuil de toxicité subchronique» sont d'autres termes qu'on pourrait utiliser, selon la durée de l'exposition.

CSEO - Concentration sans effet observé. Il s'agit de la plus forte concentration d'une substance qui, lorsque des organismes y sont exposés, ne provoque chez eux aucun effet nocif observé et statistiquement significatif. Par exemple, la CSEO pourrait être la plus forte concentration d'essai à laquelle le nombre de sujets vivants produits par des daphnies adultes ne diffère pas significativement du nombre produit par des organismes témoins. La CSEO s'applique habituellement aux effets sublétaux et, sauf indication contraire, au plus sensible d'entre eux.

Essai à renouvellement périodique - Essai de toxicité pendant lequel les solutions d'essai sont renouvelées périodiquement, généralement à intervalles de 24 h.

Essai de toxicité - Détermination de l'effet d'une substance sur un groupe d'organismes choisis, dans des conditions définies. Un essai de toxicité aquatique permet généralement de mesurer soit le nombre d'organismes affectés par l'exposition à des concentrations particulières de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats ou de milieux récepteurs (mesure absolue), soit l'intensité des effets observés (mesure relative).

Essai statique - Essai de toxicité pendant lequel les solutions d'essai ne sont pas renouvelées.

Évaluation d'identification de la toxicité - Prétraitement systématique d'un échantillon (p. ex., ajustement du pH, filtrage, aération), suivi d'un essai de toxicité. Cette évaluation permet de définir les agents qui sont les principaux responsables de la toxicité dans un mélange complexe. L'essai de toxicité peut être létal ou sublétal.

Létal - Qui entraîne la mort par action directe. Dans le cas des daphnies, on entend par «mort» la cessation de tous les signes visibles de mouvement ou d'activité, notamment en ce qui concerne l'antenne, l'antennule, le postabdomen et le battement cardiaque, observés au microscope.

Létalité aiguë - Mort d'organismes d'essai dans un bref intervalle d'exposition à une substance à expérimenter, habituellement 48 h dans le cas des daphnies.

Résultat - Variable (p. ex., le délai, la réaction des organismes soumis à l'essai) indiquant la fin d'un essai; mesure ou valeur dérivée caractérisant l'effet de la substance à expérimenter (CSEO, CL_{50}, CI_p, etc.).

Seuil de toxicité chronique - Moyenne géométrique de la CSEO et de la CMEO lors d'essais comportant une exposition chronique. *Cf.* CSE, qui est le terme recommandé.

TL_{50} - Temps létal 50 (ou médian). Il s'agit de la durée d'exposition qui causerait 50 % de mortalité au sein d'un groupe de daphnies de première génération détenues dans une solution d'essai particulière. Cette valeur est estimée par une représentation graphique puisqu'il n'existe pas de technique informatique ou mathématique normalisée qui soit d'usage courant (*cf.* annexe F).

Toxicité - Capacité propre d'une substance de provoquer des effets nocifs chez des organismes vivants.

Toxicité chronique - Effets à long terme liés à des modifications d'éléments tels que le métabolisme, la croissance, la reproduction, la survie ou l'aptitude à la survie.

Remerciements*

Le présent document a été rédigé en collaboration par D. McLeay (McLeay Associates Ltd., West Vancouver, C.-B.) et J. Sprague (Sprague Associates Ltd., Guelph, Ont.). Il s'inspire de rapports antérieurs qui décrivent des méthodes mises au point aux États-Unis (EPA, 1985a; EPA, 1989; Norberg-King, 1989). MM. G. Sergy et R. Scroggins (Protection de l'environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada) ont fait fonction de responsables scientifiques officiels et ont apporté leur collaboration et leurs conseils techniques pendant la durée des travaux.

Les membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (GITA) (*cf.* annexe A) ont participé activement à l'élaboration et à l'examen du document et méritent tous nos remerciements. Nous tenons à souligner en particulier l'apport technique des membres du sous-comité du GITA (composé de S. Abernethy[i], G. Craig[ii], K. Day[iii], T. Kovacs[iv], T. Norberg-King[v], R. Scroggins[vi], G. Sergy[vi] et G. Westlake[i]) qui a assumé la responsabilité de la première et de la dernière révision. Nous tenons également à remercier l'équipe des laboratoires d'essai d'Environnement Canada (*cf.* annexe B).

Les personnes suivantes, qui ont passé en revue la version définitive, ont apporté des observations et des conseils à la fois nombreux et utiles : T. Norberg-King (Environmental Protection Agency [EPA], Duluth, MN), K. Day (Institut national de recherche sur les eaux, Burlington, Ont.), S. Abernethy (ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale, Ont.), T. Kovacs (Institut canadien de recherches sur les pâtes et papiers, Pointe-Claire, QC), U. Cowgill (Dow Chemical, Midland, MI), B. Tepper (Procter & Gamble, Cincinnati, OH), J. Lazorchak (EPA, Cincinnati, OH), P. Lewis (EPA, Cincinnati, OH), G. Rodriguez (EPA, Denver, CO), J. Reading (État du New Jersey, Trenton, NJ), W. Waller (University of North Texas, Denton, TX), S. Rao (Environnement Canada, Burlington, Ont.), G. Dixon (University of Waterloo, Waterloo, Ont.), C. MacPherson (EVS Consultants, North Vancouver, C.-B.), et E. Lee (B.C. Research Corporation, Vancouver, C.-B.).

---

i Ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale (Ont.).
ii Beak Consultants Ltd., Brampton (Ont.).
iii Institut national de recherche sur les eaux, Burlington (Ont.).
iv Institut canadien de recherches sur les pâtes et papiers, Pointe-Claire (QC).
v Environmental Protection Agency, Duluth (MN).
vi Environnement Canada.

* Les illustrations de la page couverture ont été fournies par T. Norberg-King (EPA, Environmental Research Laboratory, Duluth, MN) et P. Orr (Beak Consultants Ltd., Brampton, Ont.).

Introduction

1.1 Contexte

Au Canada et ailleurs, on se sert d'essais de toxicité aquatique pour mesurer, prévoir et contrôler le rejet de substances potentiellement nocives pour les formes de vie aquatique indigènes. On ne peut s'attendre à ce qu'un seul organisme ou une seule méthode d'essai répondent aux besoins d'une démarche globale en matière de conservation et de protection de l'environnement. C'est pourquoi le Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (*cf.* annexe A) a récemment proposé une série d'essais de toxicité aquatique qui seraient généralement acceptables et qui permettraient de mesurer différents types d'effets toxiques chez des organismes représentatifs de différents niveaux trophiques et groupes taxinomiques (Sergy, 1987). Un essai de toxicité chronique sur une espèce de daphnie (invertébré microcrustacé d'eau douce de la famille des daphniidés) était l'un des essais de toxicité aquatique qu'on a choisi de normaliser de sorte qu'ils permettent de respecter les exigences d'Environnement Canada en matière d'essais.

Le présent rapport décrit des méthodes universelles qui s'appliquent à tout essai de toxicité chronique sur trois couvées du cladocère *Ceriodaphnia dubia*. Il présente également des ensembles particuliers de conditions et de méthodes, prescrits ou recommandés lorsqu'on applique cet essai de toxicité chronique à l'évaluation de différents types de substances (à savoir des échantillons de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats ou de milieux récepteurs) (*cf.* figure 1). Les méthodes et conditions applicables à la conduite de l'essai sont définies et, au besoin, expliquées dans des notes en bas de page.

En mettant au point ces méthodes, on s'est efforcé de mettre en balance des considérations scientifiques, pratiques et financières, en plus de veiller à ce que les résultats soient assez exacts et précis pour la majorité des cas d'application des méthodes. Les auteurs ont supposé que le lecteur connaît déjà, dans une certaine mesure, les essais de toxicité aquatique. Le présent document ne renferme pas d'instructions explicites comme celles qui pourraient s'avérer nécessaires dans un protocole réglementaire particulier; néanmoins, il est destiné à servir de document d'orientation pour cette application et d'autres utilisations.

1.2 Description de l'espèce et utilisation antérieure pour des essais

Les daphnies sont des microcrustacés d'eau douce, généralement connus sous le nom de «puces d'eau», qui appartiennent à l'ordre des cladocères. Les cladocères de la famille des daphniidés, notamment *Daphnia* sp. et *Ceriodaphnia* sp., sont omniprésents dans les eaux douces des climats tempérés (Berner, 1986). Les deux genres se retrouvent en abondance dans les lacs, les étangs et les secteurs calmes des cours d'eau de l'Amérique du Nord (Pennak, 1978). Dans ce type d'habitat, ces cladocères constituent des espèces importantes sur le plan écologique puisqu'ils sont parmi les

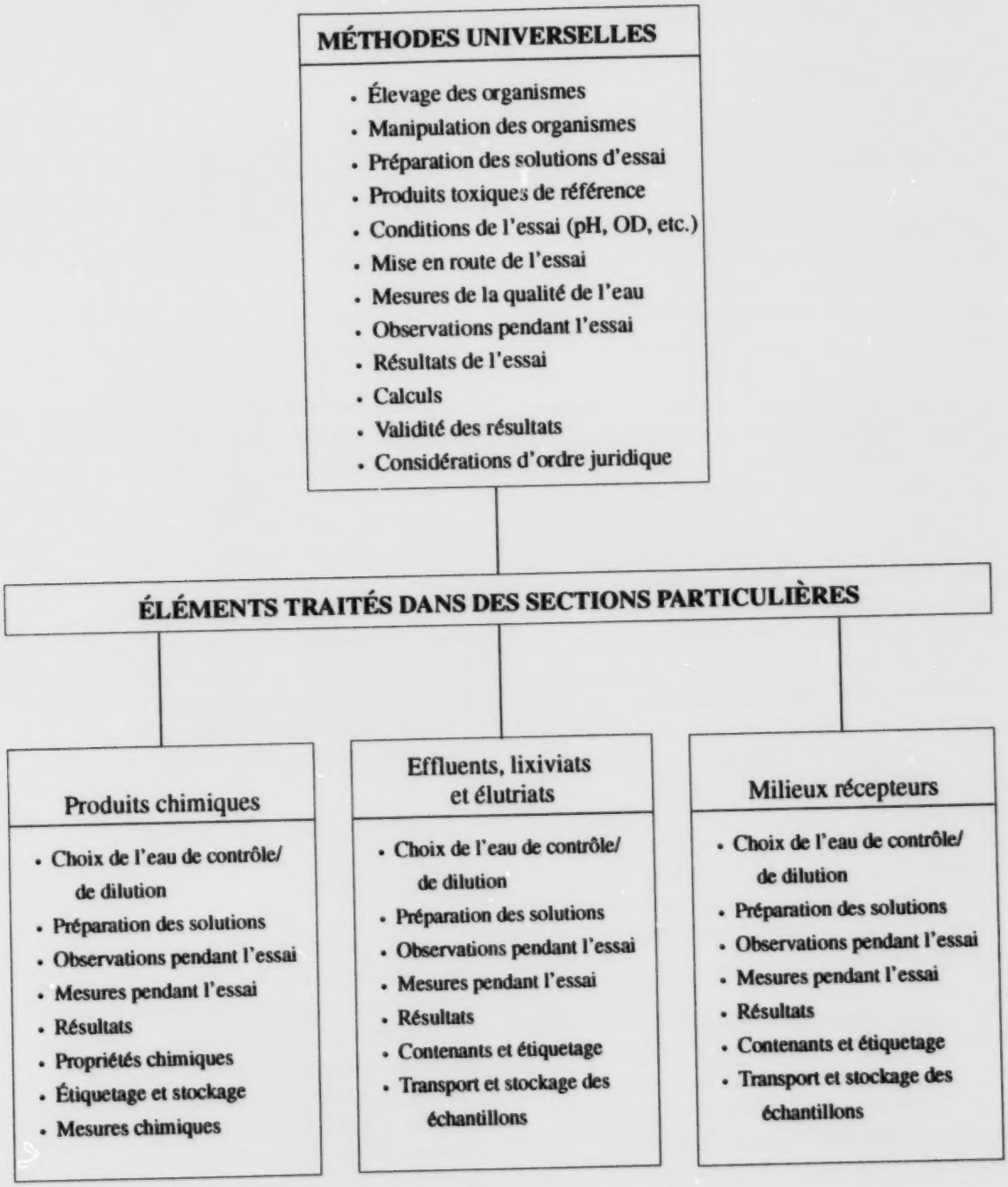


Figure 1 **Schéma de la démarche adoptée pour définir les conditions et méthodes d'essai adaptées à différents types de substances**

principaux groupes à convertir le phytoplancton et les bactéries en protéines animales (Carpenter *et al.*, 1985) et qu'ils constituent une partie importante du régime alimentaire de nombreux poissons, notamment les jeunes salmonidés.

Les daphnies constituent un bon choix pour l'exécution courante d'essais de toxicité dans les laboratoires du Canada, pour un certain nombre de raisons :

- Au Canada, on les retrouve un peu partout dans les plans d'eau douce et dans un large éventail d'habitats.

- Elles représentent un maillon important de nombreuses chaînes alimentaires aquatiques et constituent une source alimentaire appréciable pour les petits poissons.

- Elles ont un cycle de vie relativement bref et on peut les élever en laboratoire.

- Elles sont sensibles à un large éventail de contaminants aquatiques et sont très souvent utilisées dans des essais visant à évaluer la toxicité aiguë ou chronique de produits chimiques ou d'effluents.

- En raison de leur petite taille, on n'a besoin que de faibles volumes d'eau de dilution et de solutions d'essai, ce qui facilite le prélèvement et le transport des échantillons d'eaux usées et de milieux récepteurs.

Les espèces les plus grosses de *Daphnia* (c.-à-d. *D. pulex* et *D. magna*) servent depuis des années à évaluer la létalité aiguë (après 48 h) d'effluents ou de produits chimiques, et l'on dispose maintenant d'une méthode normalisée en vue d'essais de létalité aiguë sur ces espèces (Environnement Canada, 1990a). Les espèces du genre *Daphnia* (*D. magna* en particulier) servent aussi à des évaluations de la toxicité chronique (sur l'ensemble du cycle biologique) de substances chimiques et d'eaux usées (GITA, 1986), même si les essais de cette nature nécessitent beaucoup de personnel et peuvent prendre de 14 à 21 jours. Un essai de toxicité chronique sur trois couvées de *Ceriodaphnia dubia* peut normalement être mené à terme en 7 ± 1 jours; par conséquent, le coût des essais et le volume des échantillons se trouvent réduits sensiblement. Depuis qu'il est appliqué (Mount et Norberg, 1984), cet essai est devenu populaire au Canada et aux États-Unis, et il occupe maintenant une place de choix au Canada dans un grand nombre de laboratoires privés, provinciaux et fédéraux (*cf.* annexe B) qui font des essais de toxicité aquatique. Dans un certain nombre d'études, on a comparé les résultats d'essais sur trois couvées de *C. dubia* aux résultats obtenus lors de relevés *in situ*; ces études ont mis en évidence d'excellentes corrélations entre les résultats des essais et les répercussions écologiques de certains effluents (Mount *et al.*, 1984, 1985, 1986; Mount et Norberg-King, 1986; Norberg-King et Mount, 1986; Eagleson *et al.*, 1990).

Au début des années 80, l'*Environmental Protection Agency* (EPA) des États-Unis (Mount et Norberg, 1984) a mis au point un essai à renouvellement périodique d'une durée de sept jours portant sur trois couvées du cladocère *Ceriodaphnia* sp. (à l'origine, *C. reticulata*). En 1985, l'EPA a publié la méthode d'essai (sur *C. dubia*) avec deux autres méthodes d'estimation à court terme de la toxicité chronique d'effluents et de milieux récepteurs chez des organismes d'eau douce (EPA, 1985a). Depuis, l'EPA a fait paraître une méthode révisée pour cet essai (EPA, 1989); celle-ci comprend davantage de détails descriptifs et prévoit un

régime alimentaire amélioré ainsi que des méthodes modifiées et plus complètes pour le calcul des résultats des essais. L'*American Society for Testing and Materials* (ASTM) a également rédigé un guide normalisé pour l'exécution d'essais de toxicité à renouvellement périodique sur trois couvées de *C. dubia* (ASTM, 1989). Le lecteur trouvera à l'annexe C un condensé d'autres documents où sont décrites des méthodes et des conditions d'application de ce type d'essai.

Des chercheurs qui connaissent bien les méthodes établies par l'EPA (1985a, 1989) pour les essais de toxicité chronique sur *C. dubia* ont examiné quelle influence un certain nombre de conditions d'essai avaient sur les résultats obtenus; ce sont notamment la température (McNaught et Mount, 1985), la santé et les antécédents des élevages (Keating, 1985; Cooney et DeGraeve, 1986; Cowgill, 1987), le type d'aliment et le régime alimentaire (Cooney et DeGraeve, 1986; Cowgill, 1987; DeGraeve et Cooney, 1987; Cooney *et al.*, 1988; Cowgill *et al.*, 1988; Melville et Richert, 1989), la qualité de l'eau (Cooney et DeGraeve, 1986; Cowgill, 1987; DeGraeve et Cooney, 1987; Cooney *et al.*, 1988; Melville et Richert, 1989; Keating *et al.*, 1989), ainsi que la capacité et le type des contenants servant aux essais (Melville et Richert, 1989; Cowgill et Milazzo, 1989). La précision de la méthode de l'EPA (1985a) a également été évaluée lors d'études interlaboratoires et intralaboratoires (DeGraeve *et al.*, 1989). Les résultats de tous ces travaux ont été pris en considération pendant la rédaction du présent rapport.

L'objet de ce rapport est de définir une méthodologie canadienne «normalisée» d'évaluation de la toxicité chronique de différentes substances, au moyen d'essais portant sur *Ceriodaphnia dubia*. Alors que l'application d'autres méthodes publiées (*cf.* annexe C) pouvait être limitée à certains types de substances, le présent rapport doit servir à l'évaluation de la toxicité chronique de produits chimiques, d'effluents, de lixiviats, d'élutriats ou de milieux récepteurs. Les conditions et méthodes générales qui sont décrites ci-après sont en bonne partie celles de l'EPA (1989), auxquelles on a apporté des modifications et des additions utiles qui proviennent de l'ASTM (1989) et d'autres sources.

Cette méthode fait appel à de l'eau douce comme eau de contrôle/de dilution; elle est conçue pour des sujets acclimatés à l'eau douce et porte sur des effluents, des lixiviats ou des élutriats essentiellement constitués d'eau douce (c.-à-d. d'une salinité maximale de 10 g/kg) ou constitués d'eau salée mais destinés à être rejetés dans des eaux douces. On peut l'utiliser dans d'autres contextes, mais elle convient particulièrement lorsqu'il s'agit d'évaluer l'incidence réelle ou potentielle de substances sur des milieux d'eau douce. D'autres essais, portant sur d'autres espèces acclimatées à l'eau de mer, peuvent permettre de déterminer l'incidence réelle ou potentielle de substances dans des milieux estuariens ou marins, ou encore d'évaluer des eaux usées d'une salinité supérieure à 10 g/kg qui doivent être rejetées dans de tels milieux.

Section 2

Organismes soumis à l'essai

2.1 Espèce

Ceriodaphnia dubia (famille des daphniidés), microcrustacé de l'ordre des cladocères, est l'espèce qui doit servir aux essais (*cf.* figure 2). On considère que cette espèce est synonyme de *C. affinis* et que la désignation *C. dubia* a la préséance taxinomique (Berner, 1986). Certaines caractéristiques de la femelle adulte (longueur maximale : 0,9 mm; hauteur : 0,6 fois la longueur) permettent de distinguer cette espèce des organismes apparentés. En particulier, le postabdomen est modérément allongé et large (environ deux fois plus long que large); il comporte un léger point d'inflexion à mi-longueur et sept ou huit denticules anaux. La griffe postabdominale est modérément incurvée, et les trois segments des sétules latéraux (dents) sont de longueur semblable (*cf.* figure 2).

2.2 Stade du cycle biologique

Des daphnies néonates de moins de 24 h, toutes nées dans un intervalle de 8 h, doivent être utilisées au début de l'essai (EPA, 1989). Afin d'assurer une plus grande uniformité, il est souhaitable, quoique pas toujours pratique, d'utiliser des néonates qui ont moins de 12 h et qui sont toutes nées dans un intervalle de 4 h (ASTM, 1989). Ces sujets devraient provenir d'élevages individuels (c.-à-d. servant uniquement à l'obtention de néonates en vue des essais; *cf.* 2.4.1); ils devraient en outre répondre aux exigences énoncées à la division 2.4.11.

2.3 Source

On peut se procurer des élevages de *Ceriodaphnia dubia* auprès de laboratoires privés et gouvernementaux qui font des essais de toxicité. Pour obtenir des conseils sur les sources de daphnies, on peut communiquer avec le bureau régional de la Protection de l'environnement (*cf.* annexe B). Pour lancer un élevage, très peu d'organismes sont nécessaires (p. ex., de 10 à 20 néonates). Ces organismes peuvent être transportés dans une bouteille de 1 L remplie de milieu d'élevage et contenant des aliments (*cf.* 2.4).

La taxinomie jusqu'à l'espèce doit être confirmée au microscope (Berner, 1986; EPA, 1989) au début de l'élevage d'organismes provenant de sources extérieures[a]. Il est aussi conseillé d'effectuer des vérifications taxinomiques périodiques des élevages en laboratoire afin de confirmer l'espèce soumise à l'essai. Lorsqu'on lance un élevage avec des organismes qui proviennent de l'extérieur, il est recommandé de prendre un seul sujet, de le sacrifier après la production de jeunes, de le monter en préparation microscopique permanente (EPA, 1989) et de l'identifier jusqu'à l'espèce.

---

a Les premiers élevages de *Ceriodaphnia* obtenus dans les laboratoires de l'EPA à Duluth ont dérivé progressivement de *C. reticulata* à *C. dubia*. Un variant morphologique de *C. dubia* a également été identifié dans certains élevages de l'EPA (Berner, 1986).

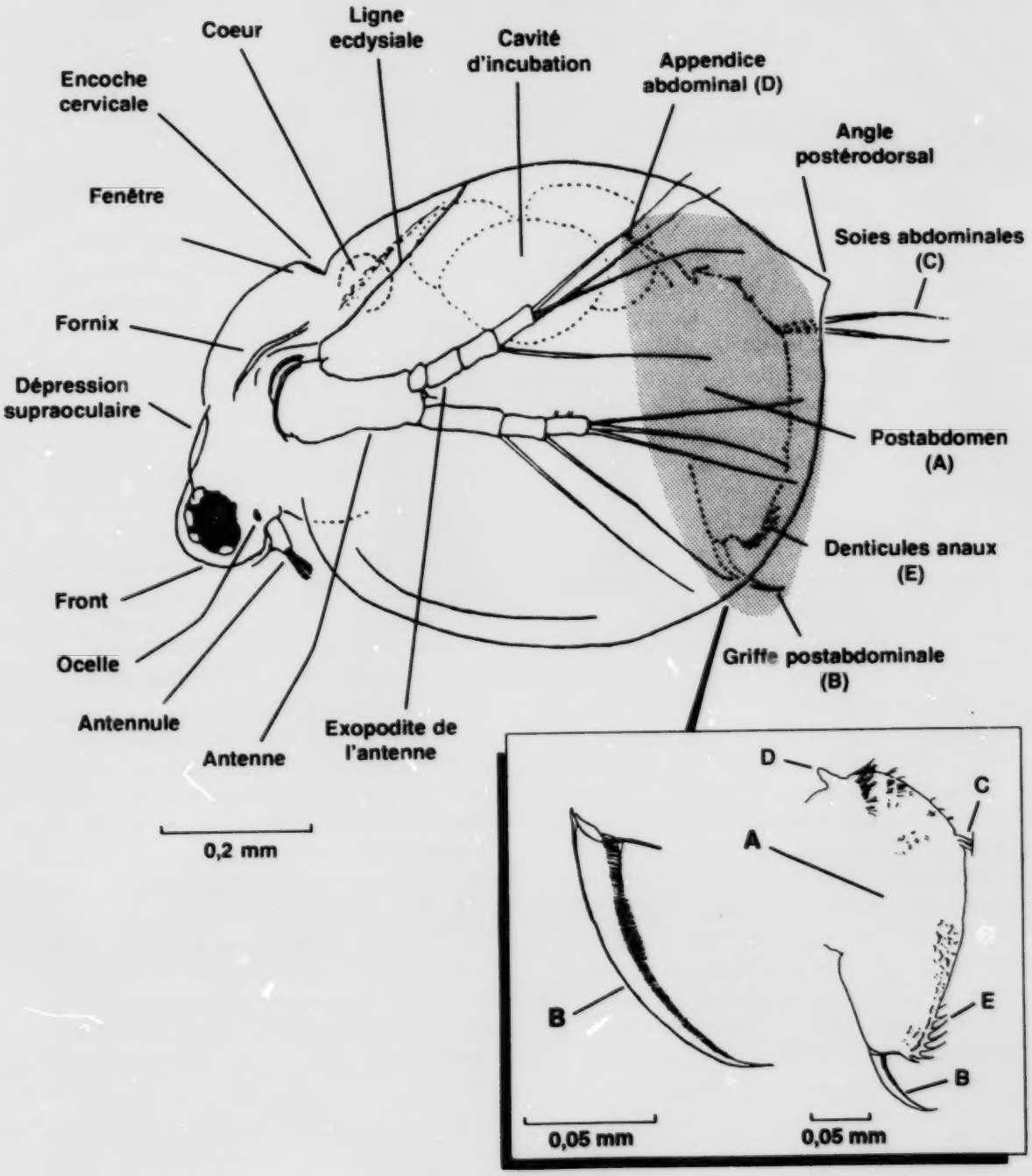


Figure 2 **Anatomie de la *Ceriodaphnia dubia* femelle**

2.4 *Élevage*

2.4.1 *Généralités*

Les conditions et méthodes recommandées ou requises pour l'élevage des daphnies sont exposées ci-après; le lecteur en trouvera un résumé au tableau 1. Elles visent à laisser une certaine marge de manoeuvre aux divers laboratoires tout en normalisant les conditions qui, si elles n'étaient pas contrôlées, pourraient nuire à la santé et au rendement des organismes.

Un vidéo de formation ainsi qu'un rapport complémentaire ont été récemment préparés par l'EPA; on y décrit et illustre les conditions et les méthodes maintenant en usage à l'*Environmental Research Laboratory* de Duluth (MN) pour l'élevage de *C. dubia* (Norberg-King, 1989). Cette source de référence, ainsi que le vidéo qui illustre la méthode d'essai, sont maintenant disponibles au Canada; on peut les consulter en s'adressant à un bureau régional d'Environnement Canada (*cf.* annexe B).

Tous les organismes utilisés pour un essai doivent provenir du même élevage. Les élevages devraient commencer au moins trois semaines avant la date où l'on a besoin de génitrices, de manière à assurer leur acclimatation aux conditions du laboratoire ainsi qu'une réserve suffisante de néonates en vue des essais. Il est recommandé de prolonger la période d'acclimatation au-delà de trois semaines (Cowgill *et al.*, 1985).

On devrait constituer et maintenir des élevages en nombre afin d'avoir assez de sujets pour démarrer des élevages individuels. Pour cela, on dépose des néonates dans un milieu d'élevage, à raison de 10 à 20 par litre. Comme la surpopulation est une source de stress et conduit finalement à l'apparition d'éphippies, on recommande des densités aussi faibles que dix adultes par volume de 3 L (Cowgill, 1989). Des densités supérieures pourraient être acceptables dans les élevages en nombre, pourvu que l'eau soit changée et que les jeunes soient retirés fréquemment et régulièrement (p. ex., tous les jours ou tous les deux jours). Au minimum, on devrait transférer les génitrices dans un nouveau milieu d'élevage au moins deux fois par semaine pendant deux semaines; au bout de cette période, on devrait éliminer les adultes et reprendre l'élevage avec des néonates dans un milieu d'élevage nouveau. À chaque renouvellement, il faudrait relever le nombre de génitrices survivantes, éliminer leurs jeunes et jeter l'ancien milieu[b]. Il est conseillé de maintenir plusieurs élevages en nombre (p. ex., quatre ou plus) dans des contenants distincts et avec des sujets d'âges différents (de 0 à 2 semaines); cela offre une garantie contre des problèmes imprévus[c]. Il ne faut pas utiliser de néonates provenant d'élevages en nombre dans les essais de toxicité.

Il faut plutôt avoir recours à des élevages individuels (c.-à-d. issus d'une seule génitrice) pour obtenir les organismes soumis à l'essai. Afin de démarrer ces élevages, on dépose des néonates provenant d'un élevage en nombre, une à une, dans une

---

b Lorsque le milieu de culture n'est pas remplacé à intervalles fréquents et réguliers et que la densité de population n'est pas réduite, on observera probablement une chute brutale de la population, la production de mâles ou la formation d'éphippies.

c Le maintien de plusieurs élevages en nombre constitue une protection contre la perte d'une population entière par suite d'accidents ou d'un effondrement de la population dans un ou plusieurs contenants.

Tableau 1 Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées pour l'élevage de *Ceriodaphnia dubia*

Source de daphnies	Maison de fournitures biologiques ou laboratoire gouvernemental; espèce confirmée par examen microscopique.
Milieu d'élevage	Eau de surface ou souterraine non contaminée, eau municipale déchlorée ou eau reconstituée; l'eau doit être remplacée au moins deux fois par semaine (élevages en nombre) ou au moins trois fois par semaine (élevages individuels).
Température	25 ± 1 °C.
Oxygénation/ aération	Aération du milieu de culture avant usage, de manière à obtenir de 90 à 100 % de saturation en O_2; pas d'aération des élevages.
pH	Entre 6,0 et 8,5.
Dureté	Correspondant, à 20 % près, à celle de l'eau de contrôle/de dilution, pendant au moins deux générations de daphnies avant l'utilisation des sujets pour les essais.
Éclairage	Éclairage fluorescent «blanc froid»; éclairement maximal de 600 lux à la surface; lumière pendant 16 ± 1 h, obscurité pendant 8 ± 1 h.
Alimentation	On recommande d'utiliser de la moulée de levure, de Cerophyll^{MC} et de truite (*Yeast, Cerophyll, Trout,* ou YCT) ainsi que des algues.
Manipulation	Minimale, à la pipette.
Critères de santé	Pour être acceptables en vue d'un essai, les génitrices des élevages individuels doivent avoir eu un taux de mortalité d'au plus 20 % et avoir produit en moyenne au moins 15 jeunes au cours de la semaine précédant l'essai, la dernière couvée devant compter au moins six individus; en outre, aucune éphippie ne doit être apparue chez les sujets d'élevage.

série de gobelets, de bechers ou de tubes à essai de 30 mL (*cf.* 2.4.2) contenant 15 mL de milieu d'élevage. On devrait transférer les génitrices dans un nouveau milieu d'élevage au moins trois fois par semaine (ordinairement, le lundi, le mercredi et le vendredi); de préférence, on devrait le faire tous les jours. Les jeunes qui appartiennent aux deux premières couvées devraient être éliminés. Ceux qui sont produits à partir de la troisième couvée peuvent être utilisés pour les essais de toxicité, pourvu que les adultes aient au plus 14 jours (Cowgill, 1989; EPA, 1989). Afin d'assurer un recoupement chronologique des élevages, il faut en lancer de nouveaux chaque semaine avec des adultes ayant produit au moins six jeunes

dans leur troisième couvée ou dans les couvées subséquentes.

2.4.2 Installations et appareillage

Les daphnies doivent être élevées dans une installation de laboratoire à température contrôlée (pièce isotherme, incubateur ou bain-marie à circulation d'eau). L'aire réservée aux élevages devrait être bien ventilée et l'alimentation en air devrait être exempte d'odeurs et de poussières. Idéalement, l'installation d'élevage devrait être isolée de l'installation d'essai afin d'atténuer les risques de contamination des élevages par les substances à expérimenter. Il y aurait lieu aussi d'isoler les élevages des secteurs du laboratoire où les solutions mères ou les solutions d'essai sont préparées, où les effluents ou les autres substances à expérimenter sont entreposées, ou encore où l'équipement est nettoyé.

Les contenants et accessoires en contact avec les organismes et les milieux d'élevage doivent être fabriqués de matériaux non toxiques. Il y aurait lieu d'utiliser le plus souvent possible des matériaux comme le verre, l'acier inoxydable de type 316, le nylon et les plastiques à base de perfluorocarbures (p. ex., Teflon^{MC}) de manière à minimiser la lixiviation et la sorption (ASTM, 1989). Des matériaux comme le cuivre, le laiton, le métal galvanisé, le plomb et le caoutchouc naturel ne doivent pas venir en contact avec les contenants ou les milieux d'élevage ni avec les échantillons et les contenants d'essai, l'eau de dilution ou les solutions d'essai. On ne devrait pas utiliser d'articles faits de matières autres que celles recommandées ci-dessus à moins qu'il ait été établi que leur usage n'a pas d'effet nocif sur la survie ou la reproduction de *C. dubia*. Tous les contenants et accessoires d'élevage devraient être nettoyés à fond (APHA *et al.*, 1989; ASTM, 1989) et rincés avec le milieu d'élevage entre les utilisations. Il faut nettoyer et laisser tremper dans de l'acide, avant de les employer, les nouveaux bechers devant servir à l'élevage ou aux essais. On devrait couvrir tous les contenants d'élevage avec du verre ou du Plexiglas^{MC} transparent afin de les mettre à l'abri de la poussière et de minimiser l'évaporation.

On peut se servir de bechers en verre (de 1 ou 2 L) ou d'autres contenants appropriés (p. ex., aquariums ou bocaux à ouverture large) pour les élevages en nombre. Lorsque les contenants utilisés à cette fin sont en plastique rigide, il faudrait les faire tremper dans de l'eau non chlorée et non contaminée pendant plusieurs jours avant de les utiliser, et il faudrait les rincer avec le milieu d'élevage. Les bechers en verre servant aux élevages en nombre ou individuels devraient être rincés à fond avec le milieu d'élevage (*cf.* 2.4.4) avant d'être utilisés.

Pour les élevages individuels et les essais, les contenants les plus couramment utilisés sont des gobelets de plastique transparent d'une contenance de 30 mL (p. ex., gobelets gradués ou gobelets en long servant à contenir la vinaigrette dans l'industrie du transport aérien), ou encore des bechers en verre borosilicaté de 30 mL; cependant, on peut utiliser des contenants plus grands ou plus petits (d'au moins 20 mL). On peut aussi utiliser de petits tubes à essai en verre à capuchon sertissable (p. ex., Ka-put^{MC}). Pour tenir les gobelets ou les bechers servant à l'élevage ou aux essais, on peut utiliser un panneau d'isolant de Styrofoam^{MC} de 50 sur 30 sur 2,5 cm dans lequel on perce six rangées de dix trous pour recevoir les contenants (EPA, 1989); on peut aussi utiliser d'autres supports.

2.4.3 Éclairage

Pendant l'élevage, la photopériode devrait normalement correspondre à une séquence

de 16 ± 1 h de lumière et 8 ± 1 h d'obscurité[d]. Un éclairage fluorescent blanc froid ou une autre source d'éclairage dont la lumière devrait tendre vers l'extrémité violette du spectre (indice de rendu des couleurs d'au moins 90) est indiqué (Buikema, 1973). L'éclairement ne doit pas dépasser 600 lux à la surface de l'eau.

2.4.4 Milieu d'élevage

L'eau pour l'élevage de *C. dubia* ne doit pas être contaminée; il peut s'agir d'eau souterraine ou de surface*, d'eau potable municipale déchlorée, d'un échantillon de milieu récepteur* prélevé en amont dans le plan d'eau visé par l'essai, d'eau minérale diluée (p. ex., solution de 20 % d'eau Perrier[MC] et de 80 % d'eau désionisée; EPA, 1989) ou encore d'eau reconstituée à dureté et à pH ajustés (*cf.* 2.4.8). Le choix de l'eau qui doit servir de milieu d'élevage peut dépendre de la substance à expérimenter (p. ex., un échantillon de milieu récepteur) ainsi que de l'eau de contrôle/de dilution; en effet, on devrait utiliser des eaux ayant des caractéristiques identiques ou semblables pour l'élevage et pour les essais (à moins que les objectifs fixés pour les essais n'obligent à procéder autrement).

Les caractéristiques de l'eau utilisée pour l'élevage des organismes (*cf.* 2.4.1) devraient être uniformes. Le milieu d'élevage devrait toujours permettre d'obtenir de bons taux de survie, de croissance et de reproduction chez les daphnies (*cf.* 2.4.11). Tout lot donné d'eau servant de milieu d'élevage (ou d'eau de contrôle/de dilution) ne devrait pas être conservé plus de 14 jours[e]. Le contenant devrait être gardé fermé et à l'abri de la lumière.

On peut utiliser de l'eau reconstituée lorsqu'il faut appliquer un mode opératoire exigeant une eau d'élevage, de contrôle ou de dilution aux caractéristiques uniformes ou lorsqu'on n'a pas accès à un approvisionnement non contaminé d'eau naturelle. On a déterminé certains problèmes inhérents à l'utilisation d'eau reconstituée[f] (DeGraeve et Cooney, 1987; Melville et Richert, 1989; Keating *et al.*, 1989); toutefois, ces problèmes peuvent être réglés en bonne partie par l'addition de quantités adéquates d'oligo-éléments (notamment le sélénium, le zinc et la vitamine B_{12}) et par un régime alimentaire équilibré (Cooney *et al.*, 1988; Cowgill, 1989; Keating *et al.*, 1989). Lorsque de l'eau reconstituée est utilisée, il est

---

d Une longue période de lumière (16 ± 1 h) stimule la reproduction asexuée (nécessaire pour l'essai), alors que de brèves périodes de lumière peuvent stimuler la reproduction sexuée (Buikema *et al.*, 1980).

e La conservation prolongée de l'eau de contrôle/de dilution ou de l'eau de contrôle peut donner lieu à une prolifération microbienne, avec les problèmes que cela implique.

* L'eau de surface devrait être filtrée sur un tamis à mailles de 60 µm afin d'éliminer les compétiteurs et prédateurs éventuels de *C. dubia*.

f Certains chercheurs (DeGraeve et Cooney, 1987; Cooney *et al.*, 1988; Melville et Richert, 1989; Keating *et al.*, 1989) ont observé, par périodes, des taux inacceptables de survie et de reproduction chez des daphnies élevées dans de l'eau reconstituée préparée selon les indications de l'EPA (1989), que ce soit avec la formule indiquée au tableau 2 ou avec une autre formule prévoyant l'utilisation d'eau minérale. Dans certains cas, ces problèmes n'étaient pas attribuables à une alimentation insuffisante ou à une carence en oligo-éléments. On a avancé l'hypothèse (Cooney *et al.*, 1988) que la présence de contaminants inconnus dans l'eau d'appoint (distillée ou désionisée) pourrait être à l'origine des problèmes inexpliqués (occasionnels) qui sont liés à l'utilisation d'eau reconstituée.

recommandé d'ajouter de 2 à 5 µg de sélénium et de 1 à 2 µg de cristaux de vitamine B_{12} à chaque litre d'eau d'élevage (Keating, 1985; ASTM, 1989; Cowgill, 1989). On trouvera à la division 2.4.8 des renseignements sur la façon de préparer une eau reconstituée d'une dureté particulière.

S'il faut utiliser de l'eau potable municipale pour l'élevage de *C. dubia* et comme eau de contrôle/de dilution, il faut la soumettre à une déchloration extrêmement efficace, car les daphnies sont très sensibles au chlore. La teneur en chlore résiduel total recommandée pour la protection des organismes d'eau douce est d'au plus 0,002 mg/L (CCMRE, 1987). Pour atteindre cet objectif, il est recommandé d'utiliser des filtres au charbon activé (noir d'os), puis un rayonnement ultraviolet (Armstrong et Scott, 1974); par ailleurs, on pourrait aussi autoclaver l'eau ou la conserver dans des réservoirs et l'aérer vigoureusement pendant plusieurs jours après la filtration au charbon.

Pour assurer la qualité du milieu d'élevage et de l'eau de contrôle/de dilution, il faudrait effectuer, aussi souvent que nécessaire, des contrôles et des évaluations des paramètres de la qualité de l'eau, dont les suivants : dureté, alcalinité, chlore résiduel (si l'on utilise de l'eau municipale), pH, carbone organique total, conductivité, solides en suspension, oxygène dissous, gaz totaux dissous, température, azote ammoniacal, nitrites, métaux et pesticides. La limite de détection de chacune des méthodes utilisées devrait être sensiblement inférieure (p. ex., de trois à dix fois) à la concentration mesurée dans l'eau, ou à la plus faible concentration ayant un effet nocif démontré sur la survie et la reproduction de *C. dubia* (ASTM, 1989).

Le milieu d'élevage ne doit pas être sursaturé en gaz. S'il y a lieu de croire qu'il peut y avoir sursaturation (p. ex., eau froide ou tiède, saturée en air, qui est chauffée à 25 °C dans un contenant fermé ou mi-fermé), on devrait vérifier fréquemment la pression de gaz totale de l'alimentation en eau (Bouck, 1982). Si la saturation en gaz dissous dépasse 100 %, il faut recourir à des mesures correctives (p. ex., l'utilisation de colonnes d'aération ou une aération vigoureuse dans un réservoir ouvert). Il n'est pas facile d'éliminer complètement la sursaturation; si l'on sait ou si l'on soupçonne que ce problème existe, il faudrait effectuer fréquemment des vérifications. La température de l'eau, sa teneur en oxygène dissous et son pH devraient être mesurés dans chaque élevage, de préférence chaque jour.

2.4.5 Température

Lorsque des daphnies de l'espèce *C. dubia* arrivent au laboratoire, l'eau ayant servi au transport devrait être progressivement remplacée par de l'eau d'élevage (*cf.* 2.4.4), sur un intervalle d'au moins deux jours. Le milieu d'élevage devrait être amené à la température souhaitée de 25 ± 1 °C à raison d'au plus 3 °C par jour. Si les élevages se retrouvent à une température inférieure ou supérieure, il faudrait la corriger progressivement (à raison d'au plus 3 °C/d) pour la ramener à 25 ± 1 °C, et la maintenir à ce niveau pendant au moins deux semaines avant le commencement des essais. On devrait vérifier périodiquement la température de l'eau dans les contenants d'élevage et la comparer à celle de la pièce isotherme, du bain-marie ou de l'incubateur pour s'assurer que la température d'élevage se trouve à l'intérieur de l'intervalle souhaité.

2.4.6 Oxygène dissous

L'eau destinée aux élevages devrait être aérée vigoureusement juste avant d'être utilisée afin d'être saturée en oxygène et

exempte de toute sursaturation en gaz. On devrait alors mesurer sa teneur en oxygène dissous pour confirmer qu'elle se situe entre 90 et 100 % de saturation. Il n'est pas nécessaire d'aérer les contenants servant aux élevages lorsque ces derniers sont conformes aux indications données à la division 2.4.1.

2.4.7 pH

Le pH du milieu d'élevage devrait être compris entre 6,0 et 8,5. Il est préférable d'utiliser un milieu dont le pH se situe entre 7,0 et 8,5.

2.4.8 Dureté

À la différence de certaines autres espèces de daphnies, *C. dubia* peut être élevée avec succès (conformément aux critères de santé donnés à la division 2.4.11) dans de l'eau douce ou dans de l'eau dure (ASTM, 1989). Néanmoins, des différences prononcées de dureté (et d'alcalinité) entre le milieu d'élevage et l'eau de contrôle/de dilution pourraient provoquer un stress osmotique. Par conséquent, *C. dubia* devrait être élevée dans une eau ayant une dureté et une alcalinité semblables ou identiques à celles de l'eau qui sera utilisée dans les essais comme eau de contrôle/de dilution[g]. Les organismes soumis à l'essai devraient être issus d'au moins deux générations de sujets élevés depuis leur naissance dans une eau dont la dureté correspond, à 20 % près, à celle de l'eau de contrôle/de dilution (*cf.* 3.4).

Il se pourrait que certains essais (p. ex., ceux qui portent sur des échantillons de milieux récepteurs ou ceux qui sont destinés à des comparaisons de résultats entre laboratoires) nécessitent l'utilisation d'eau reconstituée d'une dureté déterminée (*cf.* 4.1 et 5.3). Le tableau 2 présente des formules permettant d'obtenir de l'eau reconstituée d'une dureté et d'un pH déterminés (EPA, 1989); il existe aussi d'autres formules appropriées (p. ex., ISO, 1982). On peut aussi produire une eau adéquate à partir d'eau minérale : on obtient une eau reconstituée modérément dure de qualité acceptable en préparant un mélange constitué à 20 % d'eau Perrier[MC] et à 80 % d'eau désionisée (EPA, 1989). Une autre possibilité est de corriger la dureté de l'eau non contaminée du laboratoire (eau municipale déchlorée, eau de surface ou eau souterraine) par dilution avec de l'eau distillée ou désionisée (si elle est trop dure) ou par addition d'eau dure reconstituée ou de quantités et proportions appropriées de sels (si elle est trop douce).

2.4.9 Alimentation

Il faut nourrir les daphnies tous les jours pendant l'élevage et les essais[h]. Les aliments utilisés devraient être offerts en quantité suffisante et permettre de maintenir les organismes soumis à l'essai dans un état nutritif qui soit propice à leur croissance, à leur survie et à leur reproduction et qui soit conforme aux critères de santé définis à la division 2.4.11. Différentes combinaisons de moulée de levure, de Cerophyll[MC] et de

---

g Le milieu d'élevage pourrait être de l'eau reconstituée provenant de la même source et ayant la même formule que celle devant servir d'eau de contrôle/de dilution, ou encore de l'eau naturelle dont la dureté a été corrigée pour correspondre, à 20 % près, à celle de l'eau de contrôle/de dilution. Tout écart supérieur de dureté (ou d'alcalinité) entre le milieu d'élevage et l'eau de contrôle/de dilution pourrait conduire à des résultats erronés, en raison du stress osmotique imposé aux organismes. Dans la plupart des cas, on devrait corriger en même temps la dureté et l'alcalinité, car des ajustements distincts de ces deux paramètres sont généralement peu pratiques à opérer.

h Les organismes pourraient être stressés par une alimentation moins fréquente : cela pourrait se traduire par un faible nombre de jeunes, un nombre élevé de mâles ou la formation d'éphippies chez des femelles (EPA, 1989).

Tableau 2 Préparation d'eau reconstituée d'une dureté particulière (EPA, 1985a)[1]

Type d'eau	Réactif ajouté[2,3] (mg/L)				Qualité définitive de l'eau	
	$NaHCO_3$	$CaSO_4$[4]	$MgSO_4$	KCl	Dureté[5]	pH[6]
Très douce	12,0	7,5	7,5	0,5	10 - 13	6,4 - 6,8
Douce	48,0	30,0	30,0	2,0	40 - 48	7,2 - 7,6
Modérément dure	96,0	60,0	60,0	4,0	80 - 100	7,4 - 7,8
Dure	192,0	120,0	120,0	8,0	160 - 180	7,6 - 8,0
Très dure	384,0	240,0	240,0	16,0	280 - 320	8,0 - 8,4

1 Il est également possible de préparer une eau reconstituée d'une dureté particulière en utilisant de l'eau minérale (p. ex., eau Perrier[MC]) diluée dans l'eau désionisée. Ainsi, un mélange constitué de 20 % d'eau Perrier et de 80 % d'eau désionisée constitue une eau reconstituée modérément dure qui est de qualité acceptable (EPA, 1989).

2 Ajouter des produits chimiques de qualité «réactif» à de l'eau distillée ou désionisée. Il est recommandé d'ajouter de 2 à 5 µg de sélénium et de 1 à 2 µg de cristaux de vitamine B_{12} à chaque litre d'eau. L'eau reconstituée devrait être aérée vigoureusement dans un contenant propre pendant au moins 24 h avant son utilisation.

3 Pour gagner du temps, on peut préparer des solutions mères de $NaHCO_3$, de $MgSO_4$ et de KCl dans de l'eau désionisée. Pour obtenir des détails à ce sujet, communiquer avec J.M. Lazorchak ou P.A. Lewis, EPA, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Quality Assurance Research Division, 3411 Church Street, Cincinnati, OH 45244.

4 $CaSO4 \cdot 2H_2O$.

5 En mg/L ($CaCO_3$).

6 pH approximatif après aération de 24 h.

truite* (YCT) et d'algues unicellulaires (le plus souvent, *Selenastrum capricornutum*[i]) suffisent aux besoins de *Ceriodaphnia*, pourvu qu'elles soient administrées tous les jours (Cooney *et al.*, 1988; ASTM, 1989; Cowgill, 1989; EPA, 1989). Un régime alimentaire mixte d'algues, composé habituellement d'une algue verte (*Ankistrodesmus convolutus* ou *S. capricornutum*) et d'une diatomée d'eau douce (*Nitzchia frustulum*) semble donner des sujets en meilleure santé que les régimes alimentaires composés d'une seule espèce d'algue (Cowgill, 1989). D'autres sources

* Comme substitut de la moulée de truite commerciale, les chercheurs de l'Environmental Monitoring Systems Laboratory de l'EPA à Cincinnati, OH, recommandent l'utilisation d'une suspension alimentaire pour poissons tropicaux de marque Tetra-min[MC] (J.M. Lazorchak et P.A. Lewis, communication personnelle, 1991).

i Parmi les autres algues utilisées pour la nutrition de *Ceriodaphnia*, on compte *Ankistrodesmus convolutus*, *A. falcatus*, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Scenedesmus* sp. (Conney *et al.*, 1988; INRE, 1988; ASTM, 1989; Cowgill, 1989). On peut se procurer des cultures d'algues dans les laboratoires qui font des essais de toxicité aquatique, auprès de maisons commerciales de fournitures biologiques ainsi qu'auprès du Service de la collection de cultures de l'Université de Toronto (Dept. of Botany, University of Toronto, Toronto, Ontario M5S 1A4. Téléphone (416) 978-3641, télécopieur (416) 978-5878. Il faut calculer un délai de livraison d'environ une semaine et il y a de légers frais.)

d'aliments ont aussi été utilisées avec succès (Anon., 1989).

L'EPA (1989) recommande d'utiliser régulièrement de l'YCT et des algues pour l'alimentation de *C. dubia* afin d'assurer une bonne nutrition et l'uniformité des conditions d'élevage et d'essai. Les formules de préparation de ces aliments sont données à l'annexe D*. Le choix définitif de la ration et du régime d'alimentation est laissé à la discrétion de chaque laboratoire, en fonction de son expérience et de sa réussite quant au respect des critères de santé établis pour les organismes d'élevage (*cf.* 2.4.11).

Lorsqu'on a recours à de l'YCT et à des algues, on devrait nourrir les élevages en nombre à raison de 7 mL d'YCT et de 7 mL de concentré d'algues par litre. On devrait nourrir les élevages individuels à raison de 0,1 mL d'YCT et de 0,1 mL de concentré d'algues par 15 mL de milieu d'élevage (EPA, 1989). Les aliments devraient être ajoutés au milieu d'élevage frais immédiatement avant ou après le transfert des organismes. On devrait mélanger parfaitement le concentré d'algues et l'YCT en les agitant ensemble avant de les distribuer. Lorsque l'YCT est congelée, les aliquotes dégelées doivent être conservées dans un réfrigérateur sans être recongelées. Les quantités inutilisées d'YCT non congelée ou dégelée doivent être jetées après deux semaines. Les portions inutilisées de concentré d'algues doivent être conservées au réfrigérateur et jetées après un mois.

2.4.10 Manipulation des organismes

La manipulation de *C. dubia* devrait être réduite au minimum, et il faut protéger les contenants d'élevage contre les chocs. Les organismes devraient être transférés d'un contenant à un autre à l'aide d'une pipette de verre lisse. Une pipette jetable dont la pointe est coupée et polie à la flamme pour assurer une ouverture d'environ 2 mm est idéale à cette fin (EPA, 1985a). La pointe de la pipette devrait rester sous la surface de l'eau quand on libère les daphnies.

Les organismes qu'on a échappés ou blessés ou qui ont touché des surfaces sèches en cours de manipulation doivent être éliminés. Le volume de solution transféré avec les organismes devrait être limité à ce qui est nécessaire pour faciliter leur transfert.

2.4.11 Critères de santé

Les élevages individuels de *C. dubia* qui doivent servir à des essais de toxicité devraient respecter les critères suivants en matière de santé (ASTM, 1989; EPA, 1989) :

- Il ne faudrait pas enregistrer plus de 20 % de décès chez les génitrices des élevages individuels au cours des sept jours précédant l'essai.
- Les génitrices devraient avoir produit au moins six jeunes dans leur couvée précédente.
- Elles doivent avoir produit au moins 15 jeunes chacune, en moyenne, au cours des sept jours précédant l'essai.
- Il ne doit pas y avoir d'éphippies dans l'élevage.

L'essai de sensibilité des daphnies à un produit toxique de référence (*cf.* 4.6) fournit un autre indice de l'état de santé de l'élevage et de son aptitude à subir un essai de toxicité.

---

* Source : EPA, 1989.

Système d'essai

3.1 Installations et appareillage

L'essai peut être effectué dans un bain-marie, un simulateur d'environnement ou une installation équivalente avec un réglage efficace de température (25 ± 1 °C). Cette installation devrait être bien aérée et isolée des perturbations physiques qui pourraient influencer les organismes soumis à l'essai. En outre, l'installation d'essai devrait être isolée de l'installation d'élevage des daphnies, et la poussière et les émanations devraient être réduites au minimum dans ces installations.

Les matériaux de construction et les appareils pouvant entrer en contact avec l'eau de contrôle/de dilution ou les solutions d'essai ne devraient pas renfermer de substances susceptibles de dénaturer par lixiviation les solutions d'essai ou d'accroître la sorption de la substance à expérimenter (*cf.* 2.4.2). Le laboratoire doit être doté des appareils voulus pour mesurer les variables fondamentales de la qualité de l'eau (température, conductivité, oxygène dissous et pH), et l'on doit être prêt à effectuer une analyse rapide et exacte d'autres variables comme la dureté, l'alcalinité, l'ammoniac et le chlore résiduel.

3.2 Éclairage

Les conditions d'éclairage auxquelles les organismes sont soumis devraient être identiques à celles définies à la division 2.4.3. La photopériode (16 ± 1 h de lumière et 8 ± 1 h d'obscurité) doit coïncider avec celle à laquelle les organismes ont été acclimatés.

3.3 Récipients d'essai

Les récipients d'essai les plus couramment utilisés sont des bechers en verre ou des gobelets en plastique de 30 mL. On peut aussi utiliser des bechers en verre, des gobelets en plastique transparent ou des tubes à essai de volume supérieur ou inférieur (d'au moins 20 mL). Il est recommandé d'utiliser des supports ou des panneaux fabriqués de manière à contenir un nombre élevé de petits contenants (p. ex., six rangées de dix contenants par panneau) (*cf.* 2.4.2). Il faudrait utiliser des plaques de verre pour recouvrir les contenants servant aux essais[j].

3.4 Eau de contrôle/de dilution

Le choix de l'eau de contrôle/de dilution dépend d'un certain nombre de variables, notamment la substance à expérimenter et l'objet de l'essai (*cf.* sections 5 à 7), la dureté des solutions d'essai ainsi que la dureté et la nature de l'eau dans laquelle les organismes ont été élevés (*cf.* 2.4.4). Par conséquent, l'eau de contrôle/de dilution peut être : de l'eau souterraine ou de l'eau de surface non contaminée (provenant d'un

j Des plaques de recouvrement transparentes laissent passer la lumière jusqu'aux organismes soumis à l'essai et minimisent l'évaporation des solutions d'essai tout en réduisant leur contamination.

cours d'eau ou d'un lac), de l'eau municipale déchlorée provenant d'une source non contaminée[k], de l'eau reconstituée d'un pH et d'une dureté déterminés (*cf.* 2.4.8), ou un échantillon de milieu récepteur recueilli en amont ou à proximité de la source de contamination mais à l'abri de son influence. Lorsque de l'eau de surface doit servir d'eau de contrôle/de dilution, il faudrait la filtrer sur un filet à plancton à mailles de 60 µm pour s'assurer qu'il n'y a pas d'organismes indésirables (EPA, 1989). Les conditions relatives au prélèvement, au transport et au stockage des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux dispositions de la sous-section 6.1.

Idéalement, l'eau d'élevage et l'eau de contrôle/de dilution devraient être de qualité identique ou essentiellement semblable. Malgré tout, en raison de l'objet de l'essai (p. ex., évaluation de la toxicité de milieux récepteurs), ou encore de problèmes d'ordre pratique, logistique ou financier, on pourrait être amené à choisir une eau de contrôle/de dilution qui diffère du milieu d'élevage. La dureté (ou la dureté prévue, compte tenu d'une analyse antérieure de la source d'eau considérée) de l'eau qui doit servir de source d'eau de contrôle/de dilution devrait être connue avant le début de l'essai. Lorsque la dureté de l'eau de contrôle/de dilution diffère de plus de 20 % de celle de l'eau d'élevage, il faudrait lancer de nouveaux élevages individuels avec de l'eau de contrôle/de dilution ou avec de l'eau reconstituée dont la dureté serait ajustée de façon à répondre à ce critère. Au minimum, il faudrait acclimater à cette eau au moins deux générations de génitrices avant l'obtention des néonates destinées à servir aux essais (*cf.* 2.4.8).

---

k Il n'est pas recommandé d'ajouter du thiosulfate ou d'autres produits chimiques à l'eau de dilution afin d'éliminer le chlore résiduel, car ces substances pourraient modifier la toxicité des solutions d'essai.

Section 4

Méthodes d'essai universelles

Les méthodes exposées dans la présente section s'appliquent à l'ensemble des essais d'eaux usées et de produits chimiques visés dans les sections 5, 6 et 7. Tous les aspects du système d'essai défini dans la section 3 doivent leur être intégrés.

Le tableau 3 fournit une liste de contrôle récapitulative des méthodes recommandées pour tous les essais de toxicité sur trois couvées de *Ceriodaphnia dubia* et pour ceux portant sur des types de substances particuliers.

4.1 Préparation des solutions d'essai

Tous les contenants, dispositifs de mesure, appareils d'agitation et articles servant au transfert des daphnies doivent être nettoyés et rincés à fond, conformément à de bonnes pratiques de laboratoire. Des méthodes de nettoyage appropriées ont été établies par l'EPA (1989). L'eau de contrôle/de dilution devrait servir au rinçage final.

On peut préparer de l'eau reconstituée d'une dureté déterminée (*cf.* 2.4.8) pour l'utiliser comme eau de contrôle/de dilution. Le tableau 2 indique les types et les quantités de produits chimiques de qualité «réactif» qu'il faut ajouter à de l'eau distillée ou désionisée pour obtenir une eau de contrôle/de dilution (ou un milieu d'élevage) possédant une dureté, une alcalinité et un pH donnés. Il est recommandé d'utiliser de l'eau reconstituée «modérément dure» (de 80 à 100 mg $CaCO_3$/L) en vue d'essais exigeant un haut degré de normalisation et la comparaison des résultats obtenus[1]. L'eau reconstituée fraîchement préparée devrait être aérée vigoureusement dans un contenant non toxique pendant au moins 24 h avant son utilisation (EPA, 1989).

De l'eau souterraine, de l'eau de surface naturelle ou de l'eau municipale déchlorée, non contaminées, peuvent également subir une correction de leur dureté et servir pour le contrôle et les dilutions. On peut en effet les diluer avec de l'eau désionisée si elles sont trop dures, ou accroître leur dureté par l'addition de quantités et de proportions appropriées de produits chimiques de qualité «réactif» (*cf.* tableau 2).

Les caractéristiques de l'eau de contrôle/de dilution utilisée tous les jours pendant la durée des essais devraient être uniformes. Cette uniformité est améliorée lorsqu'un volume d'eau de contrôle/de dilution suffisant pour terminer les essais est prélevé et stocké, et que des aliquotes sont utilisées pour le renouvellement quotidien des solutions d'essai (*cf.* 4.3). Un volume de 10 L est suffisant pour toutes les analyses chimiques requises ainsi que pour le remplacement quotidien de toutes les solutions d'essai (en supposant qu'on utilise dix contenants de 15 mL chacun pour chacune de cinq concentrations d'essai et pour une solution de contrôle).

---

1 L'EPA (1989) recommande d'utiliser une eau reconstituée modérément dure (de 80 à 100 mg $CaCO_3$/L) comme milieu d'élevage et comme eau de contrôle/de dilution lors des essais servant à l'estimation de la toxicité chronique d'échantillons d'effluents. Il est avantageux de préparer une eau reconstituée modérément dure à partir d'eau minérale diluée (p. ex., une solution à 20 % d'eau Perrier^{MC}; EPA, 1989) parce que l'eau minérale risque d'être plus équilibrée qu'un autre type d'eau en ce qui concerne les oligo-éléments essentiels.

Tableau 3 Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées pour les essais de toxicité chronique sur trois couvées de *Ceriodaphnia dubia*

Méthodes universelles	
Type d'essai	À renouvellement périodique (au moins tous les jours).
Durée de l'essai	Jusqu'à ce que 60 % des organismes témoins aient produit trois couvées (normalement, 7 ± 1 jours).
Eau de contrôle/ de dilution	Eau souterraine, eau de surface ou eau municipale déchlorée, non contaminée; eau reconstituée modérément dure s'il faut assurer un haut degré de normalisation; milieu récepteur en amont pour évaluer l'effet toxique à un endroit précis. L'oxygène dissous doit être de 90 à 100 % de saturation au moment de l'utilisation. La dureté doit correspondre, à 20 % près, à celle du milieu d'élevage.
Contenant d'essai	Normalement, becher en verre, gobelet en plastique ou tube à essais de 30 mL, contenant au moins 15 mL de solution d'essai ou de contrôle.
Organismes	Néonates de *Ceriodaphnia dubia* (âgées de moins de 24 h et toutes nées dans un même intervalle de 8 h) ; un organisme par contenant ; au moins dix organismes par traitement d'essai ; tous les traitements doivent porter sur un nombre égal d'organismes.
Température	25 ± 1 °C (moyenne et limites quotidiennes).
Oxygène dissous/ aération	Aucune aération sauf exception. Oxygène dissous de 40 à 100 % de saturation pendant toute la durée de l'essai.
pH	Aucune correction si le pH de la solution d'essai est compris entre 6,0 et 8,5; un deuxième essai (à pH corrigé) pourrait s'avérer nécessaire ou pertinent si le pH de l'échantillon ou de la solution n'est pas compris dans cet intervalle.
Éclairage	Fluorescent «blanc froid»; maximum de 600 lux à la surface; 16 ± 1 h de lumière et 8 ± 1 h d'obscurité.
Alimentation	Ajouter tous les jours dans chaque contenant 0,1 mL d'YCT et 0,1 mL de suspension d'algues (ou d'autres aliments appropriés).
Mesures	Température, pH et oxygène dissous : au moins au début et à la fin de chaque période d'exposition de 24 h (avant le renouvellement du milieu), dans des concentrations représentatives. Conductivité : au moins au commencement des périodes de 24 h. Dureté de l'eau de contrôle et (au minimum) de la solution d'essai à la plus forte concentration : au moins avant le commencement de l'essai.
Observations	Tous les jours, dénombrement des organismes morts et des néonates vivantes produites.
Résultats	Mortalité et reproduction; CSEO/CMEO ou CI_p dans le cas des essais portant sur plusieurs concentrations; le cas échéant, CL_{50} après une durée donnée.

Produits toxiques de référence	Un ou plusieurs des composés suivants : chlorure de sodium, phénol ou sulfate de zinc; essai normalisé de mesure de la CSEO/CMEO ou de la CI_p, dans les 14 jours précédant ou suivant l'essai définitif.
Validité de l'essai	L'essai n'est pas valable si plus de 20 % des organismes témoins meurent ou s'il y a moins de 15 jeunes vivants par femelle survivante dans les solutions de contrôle.

Produits chimiques

Solvants	À utiliser seulement dans des cas particuliers; concentration maximale : 0,1 mL/L.
Concentration	Il est recommandé de mesurer la concentration au moins au début et à la fin de la période de renouvellement du milieu lors de la première et de la dernière journée de l'essai, dans les solutions à teneur supérieure, moyenne et inférieure et dans les solutions de contrôle.
Eau de contrôle/ de dilution	Tel qu'indiqué ou selon l'objet de l'essai; eau reconstituée s'il faut assurer un haut degré de normalisation; milieu récepteur lorsqu'on veut étudier les effets toxiques locaux; sinon, eau du laboratoire non contaminée.

Effluents, élutriats et lixiviats

Échantillons	Dans le cas d'essais à l'extérieur, trois échantillons au minimum sont prélevés ou préparés (élutriats) et utilisés comme le prévoit la sous-section 6.1. Pour les essais sur place, des échantillons sont prélevés quotidiennement et utilisés dans un intervalle de 24 h. Des volumes de 1 L (essais à une seule concentration) ou de 2 L (essais à plusieurs concentrations) sont suffisants.
Transport et stockage	Lorsque les échantillons sont chauds (plus de 7 °C), les ramener entre 1 et 7 °C sur de la glace ou des sacs réfrigérants; ils ne doivent pas geler pendant le transport. Stocker à l'obscurité entre 1 et 7 °C (de préférence à 4 ± 2 °C). Les essais devraient commencer dans les 24 h et doivent commencer dans les 72 h suivant le prélèvement ou l'extraction.
Eau de contrôle/ de dilution	Tel qu'indiqué ou selon l'objet de l'essai; eau du laboratoire, eau reconstituée ou milieu récepteur en amont pour les essais de surveillance et de conformité.
Teneur élevée en matières solides	On pourrait faire un deuxième essai sur un échantillon filtré afin d'évaluer l'effet de la présence de matières solides.

Milieux récepteurs

Échantillons	Comme pour les effluents, lixiviats et élutriats.
Transport et stockage	Comme pour les effluents, lixiviats et élutriats.
Eau de contrôle/ de dilution	Tel qu'indiqué ou selon l'objet de l'essai; milieu récepteur en amont pour étudier les effets locaux.

L'eau de contrôle/de dilution utilisée doit être amenée à la température d'essai (25 ± 1 °C) avant d'être utilisée. La sursaturation de cette eau en gaz excédentaires doit être évitée (*cf.* 2.4.4). Avant d'être utilisée, l'eau de contrôle/de dilution devrait avoir une teneur en oxygène dissous de 90 à 100 % de la valeur de saturation en air. Au besoin, on devrait aérer vigoureusement le volume nécessaire d'eau de contrôle/de dilution (au moyen d'un jet d'air comprimé exempt d'huile passant par des pierres de barbotage) immédiatement avant de l'utiliser, et on devrait vérifier sa teneur en oxygène dissous afin de confirmer que le niveau de saturation de 90 à 100 % a été atteint.

Les concentrations et le nombre de solutions à préparer dépendent de l'objet de l'essai. Les essais de surveillance et de conformité portant sur des eaux usées ou des milieux récepteurs peuvent, dans certains cas, exiger la préparation d'une seule concentration d'essai (p. ex., l'échantillon non dilué) et d'une solution de contrôle (*cf.* sections 6 et 7). Pour les essais visant à établir la CSEO/CMEO ou la CI_p, il faut préparer au moins cinq concentrations d'essai ainsi qu'une solution de contrôle (eau de contrôle/de dilution à 100 %)*. On peut utiliser une série géométrique de dilutions, dans laquelle chaque concentration successive s'établit à environ 50 % de la précédente (p. ex., 100, 50, 25, 12,5, 6,3, etc.). On peut aussi choisir des concentrations d'essai à partir d'autres séries appropriées de dilutions (*cf.* annexe E). Si l'on observe une mortalité élevée au cours des deux premières heures de l'essai, on peut ajouter d'autres solutions d'essai, plus diluées. Il n'est pas recommandé d'utiliser couramment un facteur de dilution aussi faible que 30 % (p. ex., concentrations de 100, 30, 9, etc.) parce que cela réduit la précision des estimations de la toxicité; cependant, on peut y avoir recours en cas de grande incertitude relativement à l'intervalle des concentrations qui risquent d'être toxiques.

Si l'on utilise comme eau de contrôle/de dilution une eau différente de celle dans laquelle les organismes ont été élevés, il faudrait préparer une deuxième solution de contrôle en utilisant le milieu d'élevage. On ne peut utiliser de l'eau d'amont comme eau de contrôle/de dilution si elle est toxique selon les critères de l'essai auquel elle est destinée[m]. En pareil cas, l'eau servant à l'élevage devrait être utilisée comme eau de contrôle et pour l'ensemble des dilutions.

Pour tout essai donné, la même eau de contrôle/de dilution doit servir à la préparation des solutions de contrôle ainsi que de toutes les concentrations d'essai. Chaque solution d'essai doit être bien mélangée au moyen d'une tige de verre, d'un agitateur recouvert de Teflon[MC] ou d'un autre dispositif. La température, la teneur en oxygène dissous ainsi que le pH de chaque

---

* Il peut falloir plus de cinq concentrations, notamment lorsque l'essai a pour objectif la détermination de la CL_{50}. On peut procéder à un essai préalable (de détermination de l'ordre de grandeur) avant de passer à l'essai définitif; cet essai porte habituellement sur une vaste gamme de concentrations et dure fréquemment 24 h ou moins.

m L'utilisation d'une eau autre que celle du milieu récepteur en amont, comme eau de dilution et de contrôle, ne permet pas aux substances naturelles ou aux autres contaminants présents dans le milieu récepteur de laisser apparaître quelque effet que ce soit sur la toxicité de la substance à expérimenter. Par exemple, des agents chélateurs naturels, comme des acides humiques ou fulviques, pourraient se lier à la substance à expérimenter et en réduire la toxicité. À l'inverse, la présence de contaminants dans l'eau d'amont pourrait accroître la toxicité mesurée de la substance à expérimenter si celle-ci était diluée dans cette eau.

solution d'essai devraient être vérifiés au moment du mélange.

La température de chaque échantillon ou solution devrait être ajustée, au besoin, de façon à ce qu'elle se situe dans l'intervalle acceptable (25 ± 1 °C). Seulement lorsque la teneur en oxygène dissous mesurée à ce moment dans une ou plusieurs solutions est inférieure à 40 % ou supérieure à 100 % de la valeur de saturation en air, toutes les solutions d'essai devraient être préaérées (avant l'exposition des daphnies), au moyen de bulles d'air comprimé exempt d'huile d'une taille de 1 à 3 mm, produites au moyen d'une pipette de verre jetable. Toute préaération des solutions devrait se faire au débit minimal requis pour l'aération du récipient particulier et du volume de liquide en cause. La période de préaération devrait être limitée à 20 min ou, si cette durée est plus courte, au temps voulu pour obtenir 40 % de saturation en air dans la solution d'essai de la concentration la plus élevée (ou 100 % de saturation, s'il y avait sursaturation). Toute préaération des solutions d'essai devrait normalement être interrompue à la fin de cette période, et l'essai devrait être mis en route, qu'on ait obtenu ou non de 40 à 100 % de saturation dans toutes les solutions d'essai (*cf.* 4.4.1).

Il se pourrait qu'on doive corriger le pH des échantillons ou des solutions (*cf.* 4.4.2). Des solutions d'acide chlorhydrique (HCl) ou d'hydroxyde de sodium (NaOH) de titre inférieur ou égal à 1 *N* devraient normalement être utilisées pour toutes les opérations d'ajustement du pH. Certaines situations (p. ex., des échantillons d'effluents à pouvoir tampon élevé) pourraient nécessiter l'utilisation de teneurs supérieures d'acide ou de base.

Abernethy et Westlake (1989) fournissent des lignes directrices utiles pour l'ajustement du pH. Il faudrait laisser s'équilibrer, après chaque addition d'acide ou de base, les aliquotes de solutions d'essai ou d'échantillons faisant l'objet d'un ajustement du pH[n]. Le délai nécessaire pour atteindre l'équilibre dépend du pouvoir tampon de la solution ou de l'échantillon. Pour les échantillons d'effluents, il est recommandé de prévoir une durée de 30 à 60 min pour l'ajustement du pH (Abernethy et Westlake, 1989). Une fois l'exposition des daphnies commencée, le pH de chacune des solutions d'essai est mesuré régulièrement (*cf.* 4.5), mais il n'est pas ajusté.

Lorsqu'il faut procéder à un ajustement du pH pour un essai portant sur un produit chimique ou sur un échantillon d'effluent, de lixiviat ou d'élutriat, il faut normalement corriger séparément le pH de chaque solution d'essai ou de contrôle; pour un essai portant sur un échantillon de milieu récepteur, il faut plutôt ajuster le pH d'une aliquote de l'échantillon dilué, avant de préparer les concentrations d'essai.

4.2 Mise en route de l'essai

Une fois que les solutions d'essai ont été préparées et que tous les ajustements permis ou nécessaires de température, de pH, de teneur en oxygène dissous et de teneur en matières solides ont été faits (*cf.* 4.1 et 6.4), on devrait entreprendre l'essai. Lorsqu'on

---

n Lorsqu'on dilue la substance à expérimenter et qu'on étudie la toxicité d'une ou de plusieurs dilutions chez les daphnies, il est préférable d'ajuster le pH de chacune des solutions d'essai plutôt que d'ajuster celui de la substance à expérimenter (non diluée). L'addition d'acide ou de base à un échantillon d'effluent, d'élutriat ou de lixiviat non dilué peut modifier de manière importante l'équilibre entre les formes ionisées et non ionisées de certaines substances toxiques (p. ex., ammoniac, acides résiniques) et peut détruire l'intégrité de l'échantillon à expérimenter.

s'inquiète de l'influence de la dureté de l'échantillon ou de la solution sur sa toxicité, il faudrait mesurer la dureté de l'eau au moins dans la solution de contrôle ainsi que dans les solutions d'essai à concentration supérieure et inférieure. Ces mesures initiales devraient être faites sur de gros volumes de solutions préparées dans des bechers, après tout ajustement du pH et juste avant que les solutions ne soient placées dans les contenants d'essai. Sauf lors de travaux de recherche spéciaux°, il ne faudrait tenter d'aucune façon d'ajuster la dureté des échantillons ou des solutions d'essai.

Au moyen d'une matrice (EPA, 1989) ou d'une table de chiffres disposés au hasard, il faudrait attribuer, sur un support ou un panneau, une position aux dix contenants de chaque concentration d'essai, y compris les solutions de contrôle. Lorsqu'on décide d'utiliser une matrice, il faudrait en avoir plusieurs à sa disposition (afin que les contenants ne soient pas toujours disposés dans le même ordre). Une fois qu'une position numérotée a été attribuée à chacune des solutions d'essai, on devrait ajouter un volume mesuré identique (≥15 mL) de solution à chacun des dix contenants prévus. Ensuite, ces dix contenants sont placés à leur position désignée (même numéro) sur le panneau. On répète cette opération pour chacune des solutions d'essai.

Les daphnies néonates qui sont utilisées dans les essais doivent avoir moins de 24 h et être toutes nées dans un même intervalle de 8 h; il serait préférable que les sujets aient moins de 12 h et qu'ils soient tous nés dans un intervalle de 6 h. Ces néonates devraient provenir d'élevages individuels conformes aux exigences indiquées à la division 2.4.1 et aux critères de santé indiqués à la division 2.4.11. Lorsque des essais portent sur plusieurs concentrations, on commence par choisir, sur un panneau réservé aux élevages, dix gobelets ou bechers* portant chacun huit jeunes ou plus. Pour la mise en route de l'essai, une néonate du premier gobelet d'élevage est transférée dans chacun des six contenants d'essai de la première rangée du panneau d'essai (normalement, chaque panneau comporte dix rangées et six colonnes de contenants d'essai). Un deuxième gobelet d'élevage est choisi au hasard, et une néonate de ce gobelet est transférée dans chacun des six contenants de la deuxième rangée. Cette opération est répétée jusqu'à ce que chacun des 60 contenants d'essai** contienne une daphnie néonate (EPA, 1989).

---

o Il serait possible de modifier la dureté de l'échantillon ou de la solution d'essai par l'addition de quantités et de proportions appropriées de sels (*cf.* tableau 2), dans des conditions particulières (p. ex., la tenue d'un second essai), lorsque la dureté de l'échantillon ou de la solution est sensiblement inférieure à celle de l'eau d'élevage/de contrôle/de dilution et que le chercheur veut évaluer l'influence de cette différence sur sa toxicité. La réduction de la dureté d'une solution ou d'un échantillon ne serait pas possible sans une dilution (p. ex., avec de l'eau désionisée) ou un traitement chimique; or, ni l'une ni l'autre de ces solutions n'est acceptable.

* Au lieu de gobelets ou de bechers placés sur des panneaux d'élevage, on peut utiliser de petits tubes à essai en verre reposant sur des supports (*cf.* 2.4.2).

** Selon la nature ou les objectifs de l'essai, il pourrait y avoir aussi peu que 20 contenants (c.-à-d. dix contenants de contrôle et dix contenants d'essai à concentration unique), ou il pourrait y en avoir plus de 60, en multiples de dix (plus de six concentrations d'essai, y compris la solution de contrôle).

Il faut ajouter le volume approprié d'aliments (p. ex., 0,1 mL d'YCT et 0,1 mL d'algues lorsqu'on applique le régime alimentaire sommairement décrit à l'annexe D) à chaque solution d'essai immédiatement avant ou après l'introduction de chacun des organismes d'essai (*cf.* 2.4.9). Lorsque les néonates prélevées dans des élevages individuels en vue d'un essai sont conservées dans des gobelets ou des bechers distincts pendant plus de 1 h avant leur transfert dans les solutions d'essai, il faudrait aussi les nourrir durant cette période de transition.

4.3 Renouvellement des solutions d'essai

Chacune des solutions d'essai doit être renouvelée au moins une fois par jour[p]. Les solutions de remplacement, comprenant des inoculums frais d'aliments, devraient être préparées et disposées dans des contenants sur un autre panneau d'essai (suivant le même ordre), comme le prévoient les sous-sections 4.1 et 4.2. Chacune des daphnies de première génération doit être transférée dans la solution correspondant à celle dans laquelle elle se trouvait (*cf.* 2.4.10), et tous les jeunes vivants doivent être dénombrés et éliminés. Les néonates mortes peuvent être éliminées sans être comptées (EPA, 1989), mais un relevé du nombre de néonates mortes ou non viables pourrait se révéler utile lors d'une évaluation d'identification de la toxicité (Mount et Anderson-Carnahan, 1988) ou en vue d'autres recherches. Il faudrait pratiquer une analyse chimique des solutions usées (*cf.* 4.5) et les éliminer, ou encore les conserver s'il faut procéder à d'autres dosages chimiques (*cf.* 5.4).

4.4 Conditions de l'essai

L'essai est à renouvellement périodique, c'est-à-dire que les solutions sont remplacées à intervalles de 24 h ou moins pendant toute la durée de l'essai.

Les essais sont mis en route avec un seul organisme néonate par volume de 15 mL de solution d'essai dans chacun des dix contenants prévus pour chaque solution d'essai.

Les daphnies sont nourries tous les jours pendant la durée de l'essai. Le type d'aliment et la ration administrée devraient être identiques à ce qui est prévu pour les élevages individuels à la division 2.4.9.

L'essai devrait se dérouler à une température moyenne quotidienne de 25 ± 1 °C.

On ne doit pas aérer les solutions d'essai.

L'essai se poursuit jusqu'à ce qu'au moins 60 % des daphnies de première génération, dans les solutions de contrôle, aient produit trois couvées[q]. À 25 ± 1 °C, cela devrait prendre 7 ± 1 jours. Lorsque, au neuvième jour, au moins 60 % des adultes de première génération dans les solutions de contrôle n'ont pas produit trois couvées à cette température, l'essai n'est pas valide et devrait être interrompu. En outre, l'essai n'est pas valide lorsque la mortalité dépasse 20 % chez les organismes de première génération dans les solutions de contrôle, ou

---

p Normalement, les solutions sont renouvelées à intervalles de 24 h. L'essai de substances volatiles ou instables pourrait nécessiter un remplacement plus fréquent (p. ex., toutes les 8 ou 12 h).

q Il faudrait interrompre l'essai lorsque, dans les solutions de contrôle, la mortalité chez les daphnies de première génération est supérieure à 20 % ou qu'on observe la présence d'éphippies.

lorsque la reproduction dans ces solutions est inférieure, en moyenne, à 15 jeunes vivants par adulte survivant[r].

Un essai comparatif auquel ont participé dix laboratoires a montré que la mortalité moyenne des témoins de première génération n'était que de 2 %. La production moyenne globale de jeunes était de 20 par femelle; l'intervalle des moyennes obtenues par les différents laboratoires était de 13 à 31 jeunes par femelle (Anderson et Norberg-King, 1991).

4.4.1 Oxygène dissous

Dans la plupart des cas, l'utilisation d'une eau de contrôle/de dilution saturée en oxygène (*cf.* 4.1) ainsi que le renouvellement quotidien des solutions d'essai feront que la teneur en oxygène dissous des solutions d'essai ne s'abaissera pas au point de stresser les organismes et d'influencer les résultats. La concentration en oxygène dissous dans chacun des contenants d'essai devrait se situer entre 40 et 100 % de saturation (c.-à-d. entre 3,3 et 8,2 mg/mL à 25 °C) en tout temps durant l'essai (ASTM, 1989). Lorsque les substances à expérimenter ont une demande en oxygène considérable et qu'elles subissent l'essai à des concentrations élevées (p. ex., effluent, lixiviat ou élutriat non dilué), il pourrait être nécessaire de renouveler les solutions d'essai plus souvent afin de maintenir la teneur en oxygène dissous à un niveau acceptable (≥40 % de saturation). Par ailleurs, il pourrait être prévu, dans l'objectif de l'essai, que la demande en oxygène soit un des paramètres de la toxicité d'un échantillon; le cas échéant, la fréquence habituelle de renouvellement des solutions (à intervalles de 24 h) serait appliquée de façon normale[p].

Dans certaines situations (habituellement expérimentales), les chercheurs pourraient vouloir aérer des solutions d'essai carencées en oxygène ou encore préparer des solutions de contrôle additionnelles carencées en oxygène dissous, afin d'examiner l'influence de ce paramètre sur la survie et la reproduction des daphnies (ASTM, 1989). Toute aération des solutions avant l'essai (préaération) ou au cours de celui-ci devrait se faire au débit minimal requis pour le récipient particulier et le volume de liquide en cause. L'aération devrait être assurée par des bulles d'air comprimé exempt d'huile, d'une taille de 1 à 3 mm, produites au moyen d'une pipette de verre jetable. La période de préaération devrait être limitée à 20 min ou, si cette durée est plus courte, au temps voulu pour obtenir 40 % de saturation en air dans la solution d'essai de la concentration la plus élevée (ou 100 % de saturation, s'il y avait sursaturation). Il faut signaler les cas où une aération a été pratiquée avant ou pendant l'essai (*cf.* section 8).

4.4.2 pH

Les essais de toxicité devraient normalement être effectués sans ajustement du pH. Il se peut qu'un échantillon de produit chimique, d'eau usée ou de milieu récepteur produise, pour une solution d'essai, un pH qui se situe à l'extérieur de l'intervalle de 6,0 à 8,5 et que l'on cherche à évaluer des produits chimiques toxiques plutôt que les effets létaux ou modificateurs du pH; en pareil cas, on devrait ajuster le pH des solutions d'essai ou de l'échantillon avant d'y déposer les daphnies, ou effectuer parallèlement un

---

r Lorsque les résultats d'un essai sont invalidés en raison d'un taux inacceptable de survie ou de reproduction des daphnies témoins, on devrait examiner le rendement de l'élevage en y vérifiant la reproduction (*cf.* 2.4.11). Il faudrait chercher à déterminer la présence de contaminants dans l'eau de contrôle/de dilution ainsi que toute carence nutritive ou tout autre problème associé à l'élevage ou à l'essai. Cette recherche devrait être poursuivie jusqu'à ce que la performance des témoins soit acceptable.

deuxième essai (avec ajustement du pH) au moyen d'une partie du même échantillon. Pour ce deuxième essai, avant l'exposition des daphnies, le pH initial de l'échantillon ou de chaque solution d'essai (*cf.* 4.1, note *n*) pourrait, selon les objectifs de l'essai, être neutralisé (ajusté à la valeur de 7,0) ou ramené à une valeur correspondant, à 0,5 unité près, au pH de l'eau de contrôle/de dilution. Selon une autre démarche admissible pour ce deuxième essai, on peut ramener le pH de chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle) à une valeur de 6,0 à 6,5 (si l'échantillon d'essai a ou produit un pH inférieur à 6,0) ou de 8,0 à 8,5 (si l'échantillon a ou produit un pH supérieur à 8,5).

Lorsque l'essai de toxicité vise à permettre de mieux comprendre la nature des substances toxiques présentes dans un échantillon d'effluent, d'élutriat, de lixiviat ou de milieu récepteur, on utilise souvent l'ajustement du pH, en conjonction avec un certain nombre d'autres techniques de traitement (p. ex., l'oxydation, le filtrage, l'extraction à l'air et l'addition d'agents chélateurs), pour caractériser la toxicité de l'échantillon. Mount et Anderson-Carnahan (1988) comptent l'ajustement du pH parmi neuf techniques d'évaluation d'identification de la toxicité qui, lorsqu'on les applique à des échantillons aqueux de toxicité aiguë, constituent une méthode utile pour déterminer la nature physique ou chimique des substances toxiques et leur sensibilité à la détoxication.

4.5 Observations et mesures

On doit observer les daphnies dans chaque récipient d'essai tous les jours (à des intervalles de 24 h) durant l'essai. Il est plus facile d'observer les daphnies lorsqu'on éclaire temporairement chaque récipient d'essai de côté ou en dessous, en le déposant sur une table lumineuse ou en faisant appel à un autre moyen. Un fond noir est également avantageux; il peut être combiné à un éclairage favorable si une lumière est placée sur le côté et l'autre en dessous.

Les solutions d'essai qui sont opaques en raison de leur couleur ou de la présence de matières en suspension devraient être transférées temporairement dans un plat peu profond (p. ex., boîte de Petri) en vue de faciliter l'observation de la survie des daphnies et du nombre de jeunes vivants produits. Les solutions de contrôle doivent faire l'objet d'un traitement identique. Les daphnies de première génération (c.-à-d. celles qui ont été placées dans les solutions au commencement de l'essai) qui survivent devraient être transférées dans des solutions d'essai fraîches contenues dans des gobelets ou des bechers de 30 mL le plus tôt possible après les observations (*cf.* 3.3 et 4.3).

Au moment de chaque observation, il faut enregistrer le nombre de daphnies de première génération qui sont mortes. La mort est caractérisée par l'immobilité du corps, des appendices et du coeur, observés grâce à un stéréomicroscope à dissection ou à un autre appareil grossissant[s]. Chaque daphnie de première génération vivante doit être transférée dans sa nouvelle solution d'essai (*cf.* 2.4.10 et 4.3) immédiatement après l'observation.

On doit dénombrer les néonates vivantes produites par chacune des daphnies de première génération et consigner les résultats

---

s Lorsque les substances toxiques exercent un effet narcotique, les daphnies pourraient être complètement immobilisées et leur rythme cardiaque être réduit à un ou deux battements par minute; les battements du coeur constituent alors le critère déterminant de la mort.

au cours de chaque observation quotidienne. Une fois dénombrées, ces néonates sont éliminées. Il faudrait aussi éliminer toutes les néonates qui sont mortes; normalement, il n'est pas nécessaire de les dénombrer[t].

Il faut surveiller la température pendant la durée de l'essai. Au minimum, on doit la mesurer au commencement et à la fin de chaque période d'exposition de 24 h (c.-à-d. dans les solutions fraîches et dans les solutions à éliminer), au moins dans les concentrations d'essai supérieure, moyenne et inférieure ainsi que dans les solutions de contrôle. Lorsque les relevés de température proviennent de mesures faites ailleurs que dans les contenants d'essai eux-mêmes (p. ex., dans le bain-marie, l'incubateur ou la pièce isotherme où se trouvent les contenants d'essai), on doit établir le rapport qui existe entre les valeurs consignées et la température réelle dans les contenants. L'enregistrement continuel ou la mesure quotidienne de la température minimale et de la température maximale constituent des solutions acceptables.

La teneur en oxygène dissous et le pH doivent être mesurés au commencement et à la fin de chaque période d'exposition de 24 h (c.-à-d. dans les solutions fraîches et dans les solutions à éliminer), au moins dans les concentrations d'essai supérieure, moyenne et inférieure ainsi que dans les solutions de contrôle. Pour des raisons de commodité, les mesures peuvent être faites sur un échantillon composé des dix solutions d'essai de chaque concentration ou sur une seule de ces solutions.

La dureté de l'eau de contrôle/de dilution et, au minimum, de la solution d'essai de la plus forte concentration[u] devrait être mesurée avant le début de l'essai (*cf.* 3.4, 4.1 et 4.2). Il pourrait aussi être utile de déterminer l'alcalinité de ces solutions.

Il est recommandé, comme moyen de vérifier les concentrations d'essai, de mesurer la conductivité de chaque solution d'essai nouvellement préparée avant de la transférer dans les contenants d'essai. Avec certaines substances à expérimenter[v], il pourrait être souhaitable de contrôler la conductivité de quelques solutions d'essai (p. ex., les concentrations supérieure, moyenne et inférieure ainsi qu'une solution de contrôle) au commencement et à la fin de leur période d'utilisation.

4.6 Résultats et calculs

Les résultats des essais de toxicité chronique (sur un intervalle de trois couvées) portant sur *Ceriodaphnia dubia* correspondent aux effets nocifs des substances à expérimenter sur la survie et la reproduction des daphnies. Sur le plan biologique, ces essais comportent deux résultats : le premier est fondé sur la mortalité accrue observée chez les daphnies

---

t Des néonates partiellement ou entièrement développées pourraient être libérées ou pourraient mourir dans la solution d'essai au cours de l'intervalle compris entre leur naissance et leur observation. Ces organismes ne doivent pas figurer dans les dénombrements des néonates (vivantes) produites par les daphnies de première génération au cours de l'essai (ASTM, 1989; EPA, 1989). Cependant, ces renseignements pourraient se révéler utiles lors d'évaluations d'identification de la toxicité (Mount et Anderson-Carnahan, 1988) ou en vue d'autres recherches.

u Lors d'essais sur des échantillons d'effluents, de lixiviats, d'élutriats ou de milieux récepteurs, il s'agit normalement de l'échantillon non dilué.

v Des variations de la conductivité des solutions en cours d'essai sont indicatives de modifications chimiques (p. ex., ionisation, dégradation).

de première génération, et le deuxième sur la réduction du nombre de néonates vivantes qui sont produites par chaque daphnie de première génération au cours de la période d'essai (7 ± 1 jours). Dans les deux cas, l'effet nocif est évalué par comparaison statistique des données obtenues pour les solutions d'essai et pour les solutions de contrôle. Celui des deux effets qui est le plus sensible (normalement, la réduction du taux de reproduction) est pris comme indice définitif de la toxicité.

Diverses valeurs peuvent être déduites des données recueillies; la justification et les méthodes de calcul sont examinées en détail dans un rapport de l'EPA (1989). La concentration sans effet observé (CSEO) et la concentration minimale avec effet observé (CMEO) peuvent être déduites statistiquement par l'application de la méthode de vérification des hypothèses, qu'il est recommandé d'utiliser comme technique de base. Il est aussi possible de calculer la CI_p, soit une estimation ponctuelle de la concentration inhibitrice en fonction d'un pourcentage d'effet particulier; cette valeur peut être utile à titre de complément ou de deuxième technique de base[w] (Norberg-King, 1988; EPA, 1989). Il y aurait lieu de consulter un statisticien pour les analyses des résultats.

Dans le cas de la mortalité, la CSEO/CMEO ou la CI_p sont déterminées à partir du nombre de daphnies de première génération qui sont mortes dans chacun des contenants des solutions de contrôle et des diverses concentrations d'eaux usées ou de produits chimiques. Lorsque, à une concentration donnée, toutes les daphnies de tous les contenants sont mortes, cette concentration est exclue de l'analyse qui vise à déterminer la CSEO/CMEO ou la CI_p applicable à la mortalité. Les méthodes à employer pour calculer la CSEO/CMEO sont celles qui sont indiquées dans le programme d'ordinateur

---

w Une estimation ponctuelle calculée par interpolation, qu'on appelle la concentration inhibitrice pour un pourcentage d'effet donné (CI_p), est un résultat de base utile, car elle fournit une estimation d'une concentration unique qui provoque un effet particulier plutôt que d'une paire de concentrations comme la CSEO et la CMEO. Ces dernières ont le grave inconvénient de ne pas permettre le calcul de la variance; par conséquent, il est impossible de déterminer des limites de confiance qui leur sont applicables. De la même façon, il est impossible de calculer les limites de confiance de la CSE (concentration seuil d'effet), qui correspond à la moyenne géométrique de la CSEO et de la CMEO. Cependant, il est possible d'estimer la ou les concentrations responsables d'une réduction de 20, 25 ou 50 % du nombre de néonates produites par des daphnies de première génération (c.-à-d. la CI_{20}, la CI_{25} ou la CI_{50}). Dans la plupart des cas, la CI_{20} et la CI_{25} auraient une valeur proche de la CSEO, tandis qu'on obtient une meilleure précision statistique avec la CI_{50}, et, par conséquent, une meilleure confiance dans cette estimation ponctuelle. La CI_p pourrait être obtenue au moyen d'un graphique montrant la réduction, en pourcentage, du nombre de jeunes par rapport au logarithme de la concentration d'essai. On devrait établir un graphique de ce genre afin d'obtenir une évaluation directement observable de la nature des données et afin de vérifier toute estimation mathématique. Il est possible d'estimer une CI_p grâce à la méthode d'*interpolation linéaire* sans hypothèse de départ, au moyen d'un programme informatique appelé BOOTSTRP (Norberg-King, 1988; EPA, 1989, annexe J). On peut se procurer une version à jour de ce programme en communiquant avec Environnement Canada (*cf.* annexe B).

Il est possible d'obtenir une ou plusieurs CI_p ainsi que leurs limites de confiance à 95 %. Ces calculs sont également utiles en vue de la comparaison de la toxicité de différents échantillons d'eaux usées ou de produits chimiques. Dans une telle comparaison, il serait illogique de recourir à la vérification d'hypothèses à partir de la CSEO/CMEO, pour la simple raison qu'il serait impossible d'appliquer un test de mesure de la différence significative entre ces concentrations (ou entre les CSE) pour les différents échantillons. Cependant, il est possible d'appliquer des tests statistiques aux CI_p, car des limites de confiance sont associées à chacune de ces valeurs. Ainsi, les CI_p présentent des avantages si on les prend comme résultats s'ajoutant à la CSEO/CMEO (et à la CSE) ou remplaçant ces valeurs.

TOXSTAT[x] (Gulley *et al.*, 1989). On commence par vérifier la normalité et l'homogénéité des données et on applique des tests appropriés de signification selon différents types précis de distribution ainsi que pour des ensembles de données concernant des séries de contenants rendues inégales par suite de pertes accidentelles ou pour toute autre raison. Généralement, on compare la mortalité observée dans chaque concentration d'essai à la mortalité des témoins au moyen du test de Dunnett, une méthode à comparaisons multiples (EPA, 1989). Cependant, ce test ne tient pas compte de tous les renseignements disponibles, puisque la valeur de la concentration n'est pas utilisée; par conséquent, il ne constitue pas une façon particulièrement efficace de distinguer un effet toxique (Masters *et al.*, 1991). Le test de Williams est également disponible dans le programme TOXSTAT; il est conçu de façon à être sensible aux effets attribuables à l'accroissement de la concentration d'une substance toxique (Gulley *et al.*, 1989). Le test de Williams est recommandé comme substitut du test de Dunnett.

Une CL_{50} pourrait parfois être calculée, pour des essais à concentrations multiples, en fonction d'une durée d'exposition déterminée (p. ex., deux, quatre ou sept jours). Si nécessaire, la plage des concentrations d'essai devrait être élargie vers le haut pour s'assurer qu'il y a plus de 50 % de mortalité dans au moins une concentration, de sorte qu'on puisse estimer la CL_{50}. On trouvera à l'annexe F les méthodes appropriées de calcul de la CL_{50} et de ses limites de confiance à 95 %.

Dans le cas de la reproduction, la CSEO/CMEO ou la CI_p sont déterminées à partir du nombre de néonates vivantes produites dans les divers contenants de chaque concentration d'essai. Pour calculer la CSEO et la CMEO, on compare les résultats à ceux des témoins au moyen des méthodes TOXSTAT dont il a été question précédemment au sujet de la mortalité. Ici

---

x Les méthodes indiquées dans le programme TOXSTAT (Gulley *et al.*, 1989) ne sont pas reprises en détail ici puisqu'elles sont très faciles à suivre dans la description écrite qui accompagne le programme enregistré sur disquette. On peut se procurer une version à jour de ce programme en communiquant avec Environnement Canada (*cf.* annexe B). Essentiellement, la normalité des données est évaluée au moyen du test de Shapiro-Wilks, et leur homogénéité au moyen du test de Bartlett. Lorsque les données ne correspondent pas aux exigences, il est possible de les transformer au moyen de logarithmes ou de fonctions arc sinus. On doit comprendre que la transformation pourrait diminuer la sensibilité de l'analyse ainsi que la capacité de l'essai de toxicité de détecter des différences.

Lorsque les données sont régulières ou qu'elles peuvent être rendues régulières par des transformations appropriées, on procède à une analyse de la variance. Ensuite, on a recours au test de Dunnett, un test à comparaisons multiples qui est appliqué à chacune des concentrations pour déterminer les différences significatives par rapport aux solutions de contrôle. Lorsque les nombres de contenants visés sont inégaux, on emploie plutôt le test t de Bonferroni. Comme l'indique la sous-section 4.6, le test de Williams est recommandé comme premier choix pour la comparaison des effets puisqu'il incorpore et utilise certains renseignements relatifs à l'augmentation des concentrations, plutôt que de laisser ces renseignements de côté comme le fait le test de Dunnett. Le test de Williams est disponible dans le programme TOXSTAT (Gulley *et al.*, 1989).

Lorsqu'un ensemble de données ne répond pas aux exigences de normalité ou d'homogénéité et ne peut être transformé pour y répondre, on peut utiliser des tests non paramétriques compris dans le programme TOXSTAT, soit le test de Steel et le test de Wilcoxon, applicable lorsque les nombres de contenants d'essai sont inégaux. Ces options non paramétriques constituent des outils puissants pour le traitement de données dont la distribution n'est pas normale. Ils sont toutefois moins puissants que les tests paramétriques lorsqu'ils sont appliqués à des données qui ont une distribution normale; dans ce cas, ils pourraient ne pas détecter des différences réelles d'effet et conduire à une sous-estimation de la toxicité sublétale.

encore, une analyse plus sensible peut être obtenue par l'application du test de Williams. Si une femelle meurt avant d'avoir produit des jeunes, on attribue la valeur zéro au nombre de jeunes; si elle meurt après avoir produit des jeunes, on utilise le nombre réel de jeunes dans l'analyse. Ainsi, la comparaison de la reproduction incorpore en fait la mortalité des daphnies de première génération ainsi que le taux de reproduction (EPA, 1989). La plus faible CSEO/CMEO, que ce soit pour la mortalité dans la première génération ou pour le taux de reproduction, est considérée être le résultat à retenir.

Lorsqu'on détermine la CSEO et la CMEO, on calcule souvent leur moyenne géométrique parce qu'il est plus pratique d'avoir une seule valeur que deux. Cette valeur peut être utilisée et consignée, pourvu qu'il soit établi qu'il s'agit d'une estimation arbitraire d'un seuil d'effet qui pourrait en fait se situer n'importe où dans l'intervalle entre la CSEO et la CMEO. La valeur calculée de la moyenne géométrique dépend des concentrations sur lesquelles le chercheur a fixé son choix en vue de l'essai. Il est impossible de calculer les limites de confiance d'une moyenne géométrique, non plus que d'une CSEO ou d'une CMEO. Il est recommandé d'appeler CSE, ou «concentration seuil d'effet», la moyenne géométrique de la CSEO et de la CMEO. La notion de «seuil» prend ici le sens de «point auquel commence un effet». Ce terme est parallèle aux termes CE_{50}, CSEO et CMEO, et il pourrait convenir à tout effet désigné, qu'il soit létal ou sublétal, chronique ou subchronique. Aux États-Unis, la moyenne géométrique de la CSEO et de la CMEO est souvent appelée «seuil de toxicité chronique» (*chronic value*), mais on utilise fréquemment ce terme à tort pour désigner des résultats qui ne sont pas obtenus à la suite d'une exposition chronique véritable, c'est-à-dire portant sur une partie importante du cycle biologique de l'organisme soumis à l'essai. On emploie parfois aussi le terme «seuil de toxicité subchronique» (*subchronic value*) pour désigner la moyenne des résultats d'essais qui ne sont pas vraiment chroniques.

La concentration inhibitrice qui conduit à une réduction d'un pourcentage donné du nombre de jeunes peut aussi servir de critère d'effet sublétal. Il semble que la CI_{20} et la CI_{25} obtiennent présentement la préférence à titre de critères d'effet (c.-à-d. une réduction de 20 % ou de 25 % du nombre de jeunes par rapport aux témoins). Pour entreprendre une analyse de cette nature, on pourrait commencer par tracer le graphique de la réduction, en pourcentage, du nombre de jeunes par rapport au logarithme de la concentration d'essai, et on pourrait lire la CI_{20} ou la CI_{25} sur ce graphique. Celui-ci permettrait aussi de vérifier les résultats obtenus par des opérations mathématiques. Une méthode simple d'*interpolation linéaire* conduit à l'obtention d'une estimation mathématique de la CI_p (EPA, 1989, annexe J).

Lors d'un essai à concentration unique, un test t constitue normalement la méthode appropriée pour comparer les données obtenues dans la concentration d'essai à celles obtenues dans la solution de contrôle; la méthode d'application d'un test t peut être tirée de n'importe quel manuel de statistique. On considère qu'une substance à expérimenter a un effet lorsque la mortalité est significativement supérieure ou la reproduction significativement inférieure chez les sujets soumis à l'essai à ce qu'elle est chez les sujets témoins. Les exigences relatives à l'homogénéité de la variance et à la normalité des données (EPA, 1989, annexe H; Gulley *et al.*, 1989) doivent être respectées avant que le test t standard ne soit

appliqué. Lorsque les données ne sont pas conformes à ces exigences, on pourrait choisir un test non paramétrique après consultation d'un statisticien; à ce jour, il n'existe aucun test particulier qui puisse être considéré comme étant d'usage courant.

Dans certains cas, les groupes d'essais pourraient ne pas correspondre à différentes concentrations d'un même effluent ou d'un même produit chimique, mais plutôt représenter un ensemble d'échantillons différents, comme des effluents non dilués provenant de différentes installations industrielles ou encore des eaux de surface prélevées en différents endroits. On pourrait alors chercher à déterminer non seulement si chaque échantillon diffère des témoins, mais aussi si les échantillons diffèrent les uns des autres. Une option du programme statistique TOXSTAT[a] (test de Tukey) offre cette possibilité. Pour de pareils groupes d'essais, on ne devrait pas consigner les résultats de chacun des échantillons sous forme de CSEO/CMEO, mais plutôt établir le nombre de jeunes vivants produits par les daphnies de première génération, en pourcentage du nombre produit par les sujets témoins; il faudrait aussi indiquer si la différence entre ces deux nombres est significative.

4.7 Produits toxiques de référence

L'utilisation courante de produits toxiques de référence est nécessaire à l'évaluation, dans des conditions d'essai normalisées, de la sensibilité relative des élevages de *C. dubia* ainsi que de la précision et de la fiabilité des données obtenues en laboratoire pour ces produits. La sensibilité des daphnies aux produits toxiques de référence devrait être évaluée dans un délai de 14 jours avant ou après un essai de toxicité ou pendant cet essai. Idéalement, il faudrait utiliser le même stock de génitrices avec les produits toxiques de référence qu'avec les échantillons à expérimenter.

Les critères appliqués au choix des produits toxiques de référence convenant à cet essai sont les suivants :

- facilité d'obtention du produit à l'état pur;
- durée de conservation prolongée (stabilité);
- solubilité élevée dans l'eau;
- stabilité en solution aqueuse;
- risque minimum pour l'utilisateur;
- facilité et précision de l'analyse;
- courbe dose-effet satisfaisante pour *Ceriodaphnia dubia*;
- incidence connue du pH sur la toxicité du produit chez *C. dubia*;
- influence connue de la dureté de l'eau sur la toxicité du produit chez *C. dubia*.

Pour cet essai, on recommande d'utiliser comme produits toxiques de référence un ou plusieurs des composés suivants de qualité «réactif» : chlorure de sodium, sulfate de zinc ou phénol. On devrait évaluer la sensibilité des daphnies au moyen d'essais normalisés selon les méthodes indiquées dans le présent document afin de déterminer la CSEO/CMEO ou encore la CI_p d'un ou plusieurs de ces composés chimiques. Pour les essais, il faudrait prendre l'eau de contrôle/de dilution habituellement utilisée au laboratoire ou encore une eau reconstituée

modérément dure s'il faut un haut degré de normalisation[y].

Une carte de contrôle (Environnement Canada, 1990b) devrait être établie et mise à jour pour chaque produit toxique de référence utilisé. Les CSEO ou les CI_p successives sont portées sur cette carte; on les examine afin de savoir si les résultats s'inscrivent dans un intervalle de plus ou moins deux fois l'écart-type des valeurs obtenues lors des essais précédents. On recalcule la moyenne géométrique des CSEO ou des CI_p et ses limites de contrôle (± 2 fois l'écart-type, selon une base géométrique [logarithmique]*) pour chaque CSEO ou CI_p successive jusqu'à ce que les statistiques se stabilisent (EPA, 1989; Environnement Canada, 1990b).

Lorsqu'une CSEO ou une CI_p s'inscrit en dehors des limites de contrôle, la sensibilité des jeunes et le système d'essai sont douteux. Dans la mesure où cela peut se produire 5 % du temps du fait du hasard seulement, une valeur qui s'inscrit en dehors de ces limites ne signifie pas nécessairement qu'il faille mettre en question la sensibilité de la population de daphnies ou la précision des données de toxicité produites par le laboratoire; il s'agit plutôt d'un avertissement que cela pourrait être le cas. On doit alors vérifier attentivement l'état de santé de l'élevage (*cf.* 2.4.11) ainsi que toutes les conditions d'élevage et d'essai. Selon les constatations faites, il pourrait s'avérer nécessaire d'entreprendre l'acclimatation de nouveaux élevages de daphnies en vue de leur utilisation éventuelle dans des essais de produits toxiques de référence ou de substances à expérimenter.

Le recours à des limites de contrôle n'indique pas nécessairement qu'un laboratoire produit des résultats constants. Un laboratoire qui produirait des résultats extrêmement variables pour un produit toxique de référence aurait des limites de contrôle très larges; un nouveau point de données pourrait se situer à l'intérieur des limites de contrôle, mais il n'en représenterait pas moins une variation non souhaitable des résultats obtenus dans les essais. Environnement Canada (1990b) suggère comme limite, à titre provisoire, un coefficient de variation de 20 ou 30 %, ce qui paraît correspondre à un intervalle raisonnable. Cependant, pour établir une limite des variations admissibles des résultats obtenus lors d'essais sur des produits toxiques de référence, il faudrait accumuler davantage de données sur la reproductibilité que les laboratoires canadiens peuvent atteindre lors des essais de reproduction et de survie portant sur *Ceriodaphnia dubia*.

Les solutions mères de phénol et de chlorure de sodium devraient être préparées le jour même où elles sont utilisées. Les concentrations de chlorure de sodium devraient être exprimées en poids du sel total (NaCl) dans l'eau (g/L). On devrait utiliser du sulfate de zinc (généralement de formule

---

y On devrait utiliser de l'eau reconstituée modérément dure (*cf.* tableau 2) si l'on souhaite atteindre un haut degré de normalisation, particulièrement lorsqu'on veut faire des comparaisons avec les résultats obtenus dans d'autres laboratoires (EPA, 1989). Le laboratoire qui procède à l'essai pourrait choisir d'utiliser une autre source d'approvisionnement en eau (p. ex., de l'eau souterraine ou de l'eau de surface non contaminée) comme eau de contrôle/de dilution lors des essais de routine sur les produits toxiques de référence. Cette façon de procéder est satisfaisante pourvu que des essais périodiques (p. ex., trimestriels) soient faits avec de l'eau reconstituée modérément dure.

* Lorsqu'on ne peut obtenir une distribution log-normale des CSEO ou des CI_p, il se peut qu'une moyenne arithmétique accompagnée d'un écart-type se révèle plus appropriée.

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ et d'une masse moléculaire égale à 4,398 fois celle du zinc) pour la préparation des solutions mères de zinc, qui devraient être acides (pH de 3 à 4). Ces solutions peuvent être utilisées dès leur préparation ou être conservées à l'obscurité à une température de 4 ± 2 °C pendant plusieurs semaines jusqu'au moment de l'utilisation. La concentration du zinc devrait être exprimée en mg Zn^{++}/L.

Les concentrations des produits toxiques de référence dans toutes les solutions mères devraient être mesurées au moyen de méthodes chimiques appropriées (p. ex., APHA *et al.*, 1989). Au moment de la préparation des solutions d'essai, on devrait prélever des aliquotes au moins dans la solution de contrôle et dans les solutions à teneur inférieure, moyenne et supérieure; ces aliquotes devraient être analysées immédiatement ou stockées pour analyse future, au cas où la CSEO ou la CI_p serait atypique (à l'extérieur des limites de contrôle). Si elles sont stockées, on devrait les tenir à l'obscurité, à une température de 4 ± 2 °C. Les solutions de zinc devraient être préservées avant d'être stockées (APHA *et al.*, 1989). Les aliquotes stockées nécessitant un dosage devraient être traitées sans délai aussitôt l'essai de toxicité terminé. Il est souhaitable de mesurer les concentrations dans les mêmes solutions à la fin de l'essai, une fois terminées les observations biologiques. Le calcul de la CSEO ou de la CI_p devrait être fondé sur les moyennes géométriques des concentrations mesurées, si ces moyennes diffèrent sensiblement (c.-à-d. de 20 % ou plus) des concentrations nominales et si les analyses chimiques sont exactes et fiables.

4.8 Considérations juridiques

On doit veiller à ce que les échantillons soumis à des essais soient recevables en preuve en cas de poursuites judiciaires. Pour cela, les échantillons doivent : être représentatifs de la substance échantillonnée; ne pas être contaminés par des substances étrangères; être identifiés avec précision (date, heure et lieu d'origine); être consignés clairement pour assurer la continuité de la preuve; et être analysés le plus tôt possible après leur prélèvement. Les personnes responsables de l'exécution de l'essai et de la rédaction du procès-verbal doivent assurer la continuité de la preuve en cas de procédures judiciaires (McCaffrey, 1979) ainsi que l'intégrité des résultats des essais.

Section 5

Méthodes particulières pour l'essai de produits chimiques

La présente section énonce des instructions particulières pour l'essai de produits chimiques, qui viennent s'ajouter aux méthodes exposées dans la section 4.

5.1 Propriétés, étiquetage et stockage des échantillons

On devrait obtenir des renseignements sur les propriétés du produit chimique à expérimenter, notamment sa solubilité dans l'eau, sa tension de vapeur, sa stabilité chimique, ses constantes de dissociation, son coefficient de partage n-octanol/eau et sa biodégradabilité. Il faudrait consulter la fiche technique sur la sécurité d'utilisation de ce produit, s'il en existe une. Lorsque la solubilité dans l'eau d'un produit chimique est douteuse, les méthodes admissibles utilisées antérieurement pour la préparation de solutions aqueuses de ce produit devraient être recueillies et consignées. Il faudrait également recueillir et consigner les autres renseignements existants, par exemple la formule structurelle, le degré de pureté, la nature et le pourcentage des impuretés et des additifs importants, les précautions associées à la manipulation et les estimations de la toxicité chez les humains[z]. Il faudrait en outre disposer d'une méthode admissible de dosage du produit en solution aqueuse dans l'intervalle prévu des concentrations d'essai, ainsi que de données relatives à la précision et à l'exactitude des dosages.

Pour déterminer à l'avance quelles concentrations conviennent aux essais de toxicité chronique, il est utile d'avoir une estimation de la plus faible concentration à laquelle la substance à expérimenter exerce un effet létal aigu sur *C. dubia*. Les résultats d'un essai statique de CL_{50} après 48 h (*cf.* 4.6 et annexe F), mené à 25 ± 1 °C et avec l'eau de contrôle/de dilution qui doit servir à l'essai de toxicité chronique, fournissent ce renseignement. Des daphnies néonates, élevées dans des conditions semblables ou identiques à celles où se trouvent les organismes qui doivent servir à l'essai de toxicité chronique, devraient servir à mesurer la létalité aiguë (après 48 h) de la substance à expérimenter. Les autres conditions et méthodes d'essai devraient se rapprocher le plus possible des méthodes et conditions de l'essai de toxicité chronique.

Dès réception, les contenants doivent être fermés hermétiquement et codés ou étiquetés (p. ex., nom du produit, fournisseur et date de réception). Les conditions de stockage (p. ex., température et protection contre la lumière) sont souvent dictées par la nature du produit. Les modes opératoires normalisés pour la manipulation et le stockage des produits chimiques devraient être respectés.

5.2 Préparation des solutions d'essai

On peut préparer les solutions d'essai en ajoutant des quantités prépesées (à l'aide

z La connaissance des propriétés du produit chimique aide à déterminer les précautions et exigences particulières requises pour sa manipulation et pour les essais (p. ex., essais dans des conditions spéciales d'aération, nécessité d'utiliser un solvant). L'information concernant la solubilité et la stabilité chimique en eau douce est également utile dans l'interprétation des résultats des essais.

d'une balance de précision) du produit chimique dans de l'eau de contrôle/de dilution, de façon à obtenir les teneurs nominales à expérimenter[aa], ou en y ajoutant des volumes déterminés d'une solution mère. Dans le second cas, la concentration et la stabilité de la substance à expérimenter dans la solution mère devraient être déterminées avant le commencement de l'essai. Les solutions mères qui sont sujettes à la photolyse devraient être placées à l'abri de la lumière. Les solutions mères instables servant au renouvellement des solutions d'essai doivent être préparées chaque jour ou aussi souvent qu'il le faut pour maintenir toujours les mêmes concentrations de produits chimiques dans les solutions d'essai.

On devrait préparer les solutions mères en dissolvant le produit chimique à expérimenter dans de l'eau de contrôle/de dilution. Dans le cas des substances qui ne se dissolvent pas facilement dans l'eau, les solutions mères peuvent être préparées au moyen de la technique de la colonne génératrice (Billington *et al.*, 1988; Shiu *et al.*, 1988) ou, comme second choix, par dispersion ultrasonique[bb]. On ne devrait pas utiliser de solvants, d'émulsifiants ou de dispersants organiques pour accroître la solubilité du produit chimique, sauf dans les cas où ces substances pourraient être incorporées avec ce produit dans des formulations commerciales d'usage normal. Le cas échéant, on devrait préparer une solution de contrôle supplémentaire renfermant la même concentration d'agent solubilisant que la solution la plus concentrée du produit chimique à expérimenter. Ces agents devraient être utilisés parcimonieusement : leur concentration ne devrait pas dépasser 0,1 mL/L dans toute solution d'essai (EPA, 1985b). Lorsqu'on utilise des solvants, il est préférable d'utiliser les produits suivants (EPA, 1985b; ASTM, 1989) : triéthylèneglycol, diméthylformamide, méthanol, éthanol et acétone.

5.3 Eau de contrôle/de dilution

Pour l'évaluation normale, au laboratoire, de la toxicité d'un produit chimique, l'eau de contrôle/de dilution peut être de l'eau reconstituée ou l'eau du laboratoire (eau souterraine ou de surface non contaminée ou eau municipale déchlorée) qui est utilisée de façon courante pour l'élevage de *C. dubia*. Lorsqu'on doit évaluer l'effet toxique d'un produit chimique sur un milieu récepteur particulier, on pourrait prélever des échantillons de ce milieu, à l'abri de l'influence du produit, et les utiliser pour le

---

aa Normalement, cette méthode est réservée à la préparation de solutions d'essai à forte concentration ou en grand volume. Dans les autres cas, on peut obtenir une précision supérieure en préparant une solution mère.

bb La dispersion ultrasonique n'est pas recommandée, puisque les ultrasons pourraient disperser une fraction du produit chimique toxique sous forme d'émulsion ou de fines gouttelettes qui pourraient être absorbées sélectivement par les daphnies, organismes filtreurs. En outre, cette technique peut conduire à des variations de la biodisponibilité du produit chimique à expérimenter et, par conséquent, de sa toxicité, en raison de la production de gouttelettes non uniformes et de tailles différentes. Des gouttelettes pourraient aussi migrer vers la surface en cours d'essai.

contrôle et les dilutions[m,cc,dd]. Par exemple, il peut s'agir d'évaluer l'effet toxique sur une nappe d'eau particulière de déversements ou d'applications intentionnelles de substances chimiques (p. ex., vaporisation d'un pesticide). On peut aussi se servir pour cela de l'eau naturelle du laboratoire ou d'eau reconstituée, notamment lorsque le prélèvement et l'utilisation du milieu récepteur posent des problèmes pratiques. L'eau normale du laboratoire pourrait aussi convenir en d'autres circonstances (p. ex., évaluation préliminaire ou intralaboratoire de la toxicité du produit chimique).

Lorsqu'un échantillon de milieu récepteur en amont doit servir d'eau de dilution et de contrôle, on devrait préparer une solution de contrôle distincte au moyen du milieu d'élevage (*cf.* 2.4.4). Les taux de survie et de reproduction de *C. dubia* dans dix solutions répétées de milieu d'élevage devraient être comparés à ceux des organismes soumis à l'essai dans dix solutions répétées de milieu récepteur[m,ee]. L'échantillon d'eau d'amont ne peut pas être utilisé comme eau de contrôle ou de dilution lorsque la mortalité des daphnies de première génération dépasse 20 % ou que moins de 15 jeunes par adulte survivant sont produits au cours de l'essai (*cf.* 4.4). Les conditions d'essai et les méthodes d'évaluation de chaque solution de contrôle devraient être identiques et conformes à ce que prévoit la section 4.

Lorsqu'un haut degré de normalisation est nécessaire (p. ex., lorsqu'il faut calculer la toxicité d'un produit chimique dans plusieurs installations d'essai et comparer les valeurs obtenues), il faudrait utiliser de l'eau reconstituée d'une dureté déterminée pour toutes les dilutions et comme eau de contrôle[ff]. Il est recommandé d'utiliser une eau modérément dure (de 80 à 100 mg/L) à

---

cc Les contaminants qui se trouvent déjà dans le milieu récepteur peuvent ajouter leur toxicité à celle du produit chimique ou de l'eau usée à expérimenter. Dans ce cas, de l'eau de contrôle/de dilution non contaminée (eau naturelle, eau reconstituée ou eau municipale déchlorée) donnerait une estimation plus exacte de la toxicité de la substance à expérimenter, mais pas nécessairement de son impact total sur le site visé.

Lorsque l'essai vise à déterminer l'effet d'une eau usée ou d'un produit chimique sur un milieu récepteur particulier, il importe peu que ce milieu modifie la toxicité de l'échantillon, notamment par la présence de substances humiques ou de substances toxiques additionnelles. En cas d'accroissement de la toxicité attribuable au milieu récepteur, il convient de soumettre à l'essai, au minimum, une deuxième solution de contrôle constituée d'eau d'élevage et, au maximum, une autre série de solutions à différentes concentrations en prenant le milieu d'élevage comme eau de dilution.

dd Une solution de rechange (ou un compromis) quant à l'utilisation du milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution consiste à ajuster le pH et la dureté de l'eau du laboratoire (ou d'une eau reconstituée) pour qu'ils correspondent à ceux du milieu récepteur. Selon le cas, l'ajustement peut se faire en fonction de moyennes saisonnières ou de valeurs mesurées dans le milieu récepteur à un moment particulier.

ee Une comparaison des taux de reproduction et de survie des daphnies observés dans le milieu d'élevage et dans un échantillon de milieu récepteur prélevé en amont pourrait mettre en évidence des effets toxiques démontrables qui seraient attribuables aux contaminants contenus dans l'eau d'amont.

ff Comme la dureté, le pH et d'autres caractéristiques de l'eau de contrôle/de dilution peuvent influer beaucoup sur la toxicité de la substance à expérimenter, l'emploi d'une eau reconstituée normalisée (c.-à-d. une eau modérément dure, de 80 à 100 mg $CaCO_3$/L) permet d'obtenir des résultats véritablement comparables à ceux d'autres laboratoires.

cette fin[1] (*cf.* 4.1). Lorsqu'on pense que la dureté ou d'autres caractéristiques de l'eau de dilution peuvent influer sur la toxicité de la substance à expérimenter et que l'objectif de l'étude est d'évaluer dans quelle mesure elles le font, on peut mener une série d'essais avec différentes eaux reconstituées (*cf.* tableau 2) ou naturelles.

5.4 Observations et mesures

Outre les observations relatives à la toxicité prévues à la sous-section 4.5, il faut procéder à diverses observations et mesures au cours des essais de produits chimiques.

Pendant la préparation des solutions et à chacune des périodes d'observation prescrites, on devrait examiner chaque solution afin d'observer la présence et l'évolution du produit chimique (p. ex., odeur, couleur et opacité de la solution, précipitation ou floculation du produit chimique). Toute observation devrait être consignée.

Il est souhaitable et recommandé d'analyser les solutions d'essai afin de déterminer les concentrations du produit chimique auxquelles *C. dubia* est exposée[gg]. Pour ce faire, on devrait prélever des aliquotes dans les solutions d'essai à teneur supérieure, moyenne et inférieure et dans les solutions de contrôle. À tout le moins, il faudrait analyser séparément des échantillons prélevés au commencement et à la fin de l'intervalle de renouvellement, la première et la dernière journée de l'essai (ASTM, 1989). Pour obtenir les échantillons des solutions d'essai usées, il faudrait regrouper toutes les solutions d'une même concentration.

Tous les échantillons devraient être préservés, stockés et analysés au moyen de méthodes éprouvées ayant des limites de détection acceptables, pour établir la concentration du produit chimique visé en solution aqueuse. Dans tous les essais au cours desquels on mesure la concentration, la toxicité devrait être calculée et exprimée en fonction des concentrations mesurées, sauf s'il y a de bons motifs de croire que les mesures chimiques ne sont pas exactes. Aux fins de ces calculs, on devrait caractériser chaque solution d'essai par la moyenne géométrique des concentrations mesurées auxquelles les organismes ont été exposés.

5.5 Résultats et calculs

Le résultat des essais de produits chimiques est habituellement une CSEO/CMEO ou une CI_p applicable à la survie ou à la reproduction, c'est-à-dire un ou plusieurs des résultats de base décrits à la sous-section 4.6.

L'essai n'est pas valable si la mortalité dans la solution de contrôle contenant un solvant (ou dans l'eau de contrôle non traitée) est supérieure à 20 %, ou si le taux de reproduction dans l'une ou l'autre des solutions de contrôle est inférieur, en moyenne, à 15 jeunes par adulte survivant (*cf.* 4.4).

---

gg Il n'est pas nécessaire d'effectuer ces analyses dans tous les cas, en raison des limites de l'analyse, des coûts à engager ou de l'existence de données techniques antérieures indiquant la stabilité du produit chimique en solution dans des conditions analogues à celles de l'essai. Les analyses chimiques sont particulièrement recommandables si (EPA, 1985b) : la substance à expérimenter précipite ou est volatile ou insoluble; on sait que cette substance est absorbée par les matériaux de fabrication des contenants d'essai; les solutions d'essai sont aérées. Dans certains cas (p. ex., l'essai de pesticides en vue de leur homologation), il pourrait être obligatoire de mesurer les concentrations de produit chimique dans les solutions d'essai.

Section 6

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons d'effluents, d'élutriats et de lixiviats

La présente section énonce des instructions particulières pour le prélèvement, la préparation et l'essai d'échantillons d'effluents, d'élutriats et de lixiviats; ces instructions viennent s'ajouter aux méthodes exposées dans la section 4.

6.1 Prélèvement, étiquetage, transport et stockage des échantillons

Les contenants utilisés pour le transport et le stockage des échantillons d'effluents, de lixiviats et d'élutriats doivent être fabriqués de matériaux non toxiques. On accordera la préférence aux contenants en verre ou revêtus de Teflon[MC], qui sont inertes et n'absorbent guère de produits chimiques. Les contenants de polyéthylène ou de polypropylène qui servent au transport d'eau potable sont moins intéressants, mais ils peuvent aussi être utilisés pour le transport et le stockage des échantillons. Les contenants doivent être neufs, ou encore nettoyés à fond et rincés avec de l'eau non contaminée; ils devraient également être rincés avec l'échantillon à recueillir. Il faudrait les remplir de manière à réduire les vides d'air.

La plupart des essais sur des effluents, des élutriats et des lixiviats ne sont pas faits sur place, mais dans un laboratoire à milieu contrôlé. Le prélèvement des échantillons d'effluents ou de lixiviats devrait se faire à trois occasions distinctes, à intervalles de deux ou trois jours. Le calendrier d'échantillonnage devrait prévoir la livraison d'échantillons frais la première, la troisième ainsi que la cinquième journée de l'essai[hh]. Lorsque c'est possible, on devrait aussi préparer des aliquotes fraîches des échantillons d'élutriats et les livrer au laboratoire conformément à ce calendrier[ii]. Lorsque les essais sur des échantillons d'effluents ou de lixiviats sont faits dans des installations à milieu contrôlé situées sur place (p. ex., dans un laboratoire mobile ou industriel), des échantillons devraient être recueillis tous les jours et utilisés dans un délai de 24 h pour le renouvellement des solutions d'essai (EPA, 1989).

Un échantillon de 2 L suffit pour la tenue d'un essai à concentrations multiples (p. ex., à 100, 50, 25, 12,5, 6,3, 3,2 et 1,6 %) dans une installation qui n'est pas située sur place et pour les analyses courantes des échantillons. Il en faut moins pour les essais qui portent sur une concentration unique (*cf.* 4.6). Au moment du prélèvement, chaque contenant doit être rempli, fermé hermétiquement et étiqueté ou codé. Les renseignements qui doivent figurer sur l'étiquette comprennent au moins le type et

---

hh Le premier échantillon servirait au démarrage de l'essai (jour 1) et au renouvellement des solutions au jour 2. Le deuxième échantillon servirait au renouvellement des solutions aux jours 3 et 4. Le troisième échantillon servirait au renouvellement des solutions aux jours 5, 6 et 7 (EPA, 1989).

ii Il n'est pas recommandé de stocker des échantillons d'élutriats pendant un intervalle prolongé en vue de leur utilisation lors d'un essai de sept jours à renouvellement périodique, à cause de doutes quant à la stabilité de ces échantillons.

la source de l'échantillon, la date et l'heure du prélèvement ainsi que le nom du préposé à l'échantillonnage. Les échantillons reçus par le laboratoire dans des contenants non étiquetés ou non codés ne devraient pas être retenus pour les essais. Il en est de même pour ceux reçus dans des contenants partiellement remplis ou non fermés hermétiquement, car les substances toxiques volatiles peuvent alors s'échapper. Par ailleurs, lorsqu'on sait que la volatilité ne pose pas de problème, ces échantillons pourraient faire l'objet d'essais, à la discrétion de l'expérimentateur.

L'essai des échantillons d'effluents et de lixiviats devrait être entrepris le plus tôt possible après leur prélèvement. Chaque fois que possible, les essais devraient démarrer moins de 24 h et ils doivent démarrer moins de 72 h après le prélèvement des échantillons. Les échantillons prélevés pour extraction et essai de l'élutriat devraient aussi faire l'objet d'un essai le plus tôt possible, dans les dix jours suivant leur réception. L'essai des élutriats devrait commencer moins de 72 h après leur préparation ou dans les délais indiqués dans le règlement ou le protocole expérimental pertinent.

Tous les échantillons d'effluents ou de lixiviats devraient être gardés au frais (de 1 à 7 °C, mais de préférence à 4 ± 2 °C) pendant le transport et le stockage. Au moment du prélèvement, les échantillons chauds (plus de 7 °C) devraient être ramenés entre 1 et 7 °C avec de la glace ou des sacs réfrigérants. Il faudrait utiliser de ces sacs ou d'autres moyens de réfrigération pour s'assurer que la température des échantillons demeure entre 1 et 7 °C durant le transport. Les échantillons ne doivent pas geler pendant le transport.

À l'arrivée au laboratoire, l'aliquote d'effluent ou de lixiviat requise à ce moment peut être ramenée immédiatement ou au cours de la nuit à 25 °C en vue de l'essai. Les aliquotes restantes qui sont destinées au renouvellement des solutions devraient être conservées à l'obscurité dans des contenants hermétiques et à une température comprise entre 1 et 7 °C, de préférence à 4 ± 2 °C.

Sauf indication contraire, la température pendant le transport et le stockage des élutriats ainsi que des échantillons destinés à l'extraction aqueuse et à l'essai ultérieur de l'élutriat devrait être conforme aux indications ci-dessus.

6.2 Préparation des solutions d'essai

Les contenants d'échantillons doivent être agités vigoureusement juste avant d'être vidés afin d'assurer la resuspension des solides décantables. Les sous-échantillons (c.-à-d. les échantillons répartis dans deux ou plusieurs contenants) doivent être mélangés ensemble, et l'échantillon composite (ou une partie de cet échantillon) doit être retourné dans les contenants de sous-échantillons et stocké (*cf.* 6.1) jusqu'au moment de l'utilisation.

Les échantillons susceptibles de contenir de petits organismes qui pourraient concurrencer ou attaquer les organismes soumis à l'essai devraient être filtrés sur un filet à plancton à mailles de 60 µm avant d'être utilisés (EPA, 1989). Lorsqu'on craint que le filtrage puisse avoir des effets sur la toxicité de l'échantillon[jj], on devrait faire un

---

jj Le filtrage d'un échantillon pourrait causer l'extraction de matières décantables ou en suspension qui sont représentatives de la substance à expérimenter et qui pourraient modifier sa toxicité chez les organismes soumis à l'essai.

second essai en parallèle avec des portions non filtrées de l'échantillon.

6.3 Eau de contrôle/de dilution

Pour les essais de surveillance et de conformité réalisés sur des échantillons d'effluents ou de lixiviats, on devrait utiliser comme eau de contrôle/de dilution l'eau naturelle ou reconstituée dans laquelle les daphnies sont élevées, ou encore un échantillon de milieu récepteur (*cf.* 4.1, note *m* et 5.3, notes *cc* et *dd*). Étant donné que les résultats pourraient varier selon la source d'eau employée, on doit fixer les objectifs de l'essai avant d'effectuer ce choix. Il faudrait également tenir compte des difficultés et des coûts liés au prélèvement et au transport d'échantillons de milieu récepteur devant servir d'eau de contrôle/de dilution.

L'utilisation du milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution pourrait être souhaitable dans certains cas, lorsqu'il faut recueillir des renseignements propres au site visé concernant l'effet toxique potentiel d'un effluent, d'un lixiviat ou d'un élutriat sur un milieu récepteur particulier (*cf.* 5.3, notes *cc* et *dd*). Un bon exemple serait un essai en vue de détecter un effet sublétal en périphérie d'une zone de mélange, dans le cadre d'exigences réglementaires propres à un lieu donné. Les conditions de prélèvement, de transport et de stockage des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux dispositions de la sous-section 6.1.

Si un échantillon de milieu récepteur prélevé en amont doit être utilisé comme eau de contrôle/de dilution, une solution de contrôle distincte devrait être préparée à partir du milieu d'élevage. Les conditions d'essai et les méthodes d'évaluation de chacune des solutions de contrôle devraient être identiques et conformes aux dispositions de la section 4 et de la sous-section 5.3.

Pour les essais qui nécessitent un haut degré de normalisation, on peut faire appel à de l'eau reconstituée d'une dureté particulière (*cf.* tableau 2) comme eau de contrôle/de dilution (*cf.* 5.3, note *ff*). Il convient notamment de le faire dans le cas de recherches visant à établir un lien entre des données de toxicité concernant différents types ou sources d'effluents, de lixiviats ou d'élutriats, lorsque ces données sont produites par divers établissements ou qu'elles le sont par un seul établissement où la qualité de l'eau est variable. Il est alors souhaitable de minimiser toute variation attribuable à des différences dans la chimie de l'eau de dilution.

Il est recommandé d'utiliser de l'eau reconstituée modérément dure (de 80 à 100 mg/L) si un seul type d'eau synthétique doit servir d'eau de contrôle/de dilution (EPA, 1989). Les essais portant sur l'influence exercée par la chimie des milieux récepteurs sur la toxicité chronique des effluents, des lixiviats ou des élutriats pourraient être répétés avec une série d'eaux reconstituées (*cf.* tableau 2) ou d'eaux naturelles qui différeraient par leur dureté ainsi que d'autres caractéristiques.

6.4 Conditions de l'essai

Normalement, les échantillons d'effluents, de lixiviats ou d'élutriats ne sont ni filtrés ni agités durant les essais. Cependant, la présence en forte concentration de matières solides inorganiques ou organiques en suspension dans un échantillon pourrait nuire aux daphnies, qui sont des organismes filtreurs (Robinson, 1957; Arruda *et al.*, 1983; McCabe et O'Brien, 1983;

Hall et Hall, 1989). En outre, des concentrations élevées de matières biologiques dans certains types d'effluents traités pourraient ajouter à la toxicité des échantillons à cause de la production d'ammoniac ou de nitrites (Servizi et Gordon, 1986). On devrait procéder à un essai additionnel lorsqu'on craint un accroissement de la toxicité par suite de la présence en concentration élevée de matières décantables ou en suspension dans les échantillons d'effluents, d'élutriats ou de lixiviats et lorsque la recherche a pour objet de quantifier la toxicité attribuable aux matières contenues dans les échantillons. Pour ce second essai, on devrait utiliser une partie de l'échantillon traitée par filtrage ou par décantation afin d'éliminer les matières solides, mais la démarche adoptée devrait être identique par ailleurs.

6.5 Observations et mesures

Les taux de survie et de reproduction des daphnies doivent être observés et consignés à intervalles de 24 h tout au long de l'essai, conformément à la sous-section 4.5.

La couleur, la turbidité, l'odeur et l'homogénéité (c.-à-d. la présence de matières flottables ou de solides décantables) de l'échantillon d'effluent, de lixiviat ou d'élutriat devraient être observées au moment de la préparation des solutions d'essai. La précipitation, la floculation, le changement de couleur, l'odeur ou d'autres réactions au moment de la dilution avec l'eau devraient être consignés, comme tous les changements d'aspect des solutions pendant l'essai (p. ex., le moussage, la décantation, la floculation, l'augmentation ou la diminution de la turbidité et les variations de couleur).

Lorsque les échantillons d'effluent ont une teneur appréciable en matières solides, il est souhaitable de mesurer leur teneur totale en matières en suspension et en matières décantables (APHA *et al.*, 1989) dès leur réception; ces renseignements, qui font partie de la description générale de l'effluent et des caractéristiques des échantillons, pourraient influer sur les résultats de l'essai de toxicité.

6.6 Résultats et calculs

Les essais de surveillance et de conformité devraient normalement porter, au minimum, sur dix aliquotes de l'échantillon non dilué (ou dilué à une concentration spécifiée) ainsi que sur dix aliquotes d'une solution de contrôle. Selon les exigences réglementaires précisées, les essais de conformité pourraient porter sur une seule concentration (100 % d'eaux usées, sauf indication contraire); ils pourraient permettre de déterminer la CSEO/CMEO ou la CI_p, ou encore de calculer la CL_{50} après 7 ± 1 jours ou une autre durée d'exposition, lorsqu'il y a une forte mortalité (*cf.* 4.6).

Les essais de toxicité réalisés à d'autres fins (p. ex., la détermination de sources de toxicité chronique à l'intérieur d'une usine, de l'efficacité d'un traitement, des effets de la modification de procédés ou encore de variations des caractéristiques du milieu récepteur sur la toxicité chronique, ainsi que la tenue d'études interlaboratoires) pourraient, selon les objectifs de l'étude, porter sur une seule concentration (sans dilution ou à une dilution appropriée, ainsi qu'un contrôle) ou sur des concentrations multiples. Les essais à concentration unique sont souvent un moyen économique d'établir la présence ou l'absence d'une toxicité mesurable ou de faire une évaluation préliminaire d'un nombre important

d'échantillons afin d'établir leur toxicité relative. Les résultats de ces essais dépendent toujours des objectifs de l'étude, mais il pourrait s'agir, notamment, de cotes arbitraires de réussite ou d'échec, d'un pourcentage de mortalité, ou encore d'un nombre de jeunes produits dans les solutions d'eaux usées et de contrôle après 7 ± 1 jours (*cf.* 4.6). On devrait réaliser des essais à concentrations multiples sur des échantillons d'élutriats, de lixiviats ou d'effluents et en calculer les résultats (p. ex., CL_{50}, CSEO, CMEO, CI_p) lorsqu'on s'attend à ce qu'il y ait une toxicité chronique et que l'objectif de l'essai est de définir la plus forte concentration d'eau usée qui n'est manifestement pas nocive pour les organismes soumis à l'essai au cours d'une exposition prolongée.

Section 7

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons de milieux récepteurs

Le lecteur trouvera ci-après des instructions pour l'essai d'échantillons de milieux récepteurs, qui viennent s'ajouter aux méthodes exposées dans la section 4.

7.1 Prélèvement, étiquetage, transport et stockage des échantillons

Les méthodes de prélèvement, d'étiquetage, de transport et de stockage des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux dispositions de la sous-section 6.1. Les essais devraient être mis en route le plus tôt possible après le prélèvement des échantillons, de préférence moins de 24 h et pas plus de 72 h après l'échantillonnage.

7.2 Préparation des solutions d'essai

Les contenants devraient être agités avant d'être vidés, afin d'assurer l'homogénéité des échantillons. Les sous-échantillons devraient être composés comme le prévoit la sous-section 6.2.

Chaque échantillon de milieu récepteur devrait être filtré sur un filet à plancton à mailles de 60 µm avant d'être utilisé, afin de retirer les compétiteurs et prédateurs potentiels de *C. dubia*. Un second essai (avec échantillon non filtré) pourrait être fait si l'on pensait que le filtrage peut modifier la toxicité de l'échantillon[jj].

7.3 Eau de contrôle/de dilution

Pour les échantillons de milieux récepteurs prélevés au voisinage d'un point de rejet d'eaux usées, d'un déversement de substances chimiques ou d'une autre source ponctuelle de contamination possible, on peut prélever simultanément de l'eau en amont et l'utiliser comme eau de contrôle/de dilution pour les échantillons d'aval (*cf.* 5.3, notes *cc* et *dd*, et 4.1, note *m*). Cette eau devrait être prélevée le plus près possible des sources de contamination en cause, mais en amont ou à l'extérieur de leur zone d'influence, et on devrait la filtrer afin d'en extraire les organismes, comme le prévoit la sous-section 6.2.

Si l'on utilise de l'eau d'amont comme eau de contrôle/de dilution, on devrait préparer une solution de contrôle distincte à partir de l'eau du laboratoire qui sert normalement à l'élevage de *C. dubia*. Les conditions de l'essai ainsi que les méthodes de préparation et d'évaluation de chacune des solutions de contrôle devraient être identiques et conformes aux dispositions des sous-sections 4.1 et 5.3.

Des contraintes logistiques, les effets toxiques prévus ou d'autres détails pratiques propres à l'emplacement pourraient empêcher l'utilisation d'eau d'amont comme eau de contrôle/de dilution. En pareil cas, il y aurait lieu d'utiliser une autre source d'eau non contaminée pour l'élevage des daphnies (*cf.* 2.4.4), comme eau de contrôle et pour toutes les dilutions (*cf.* 5.3, note *dd*). La dureté de l'eau choisie à cette fin devrait être

semblable à celle de l'eau d'essai. À cette fin, on peut choisir ou préparer une eau non contaminée (naturelle ou reconstituée) qui a la dureté voulue, et y élever les génitrices et les organismes soumis à l'essai avant la tenue des essais (*cf.* 3.4).

7.4 Observations et mesures

La couleur, la turbidité, le moussage, la précipitation et les autres caractéristiques de l'échantillon et des solutions devraient être observés conformément aux dispositions de la sous-section 6.5, aussi bien pendant la préparation des solutions d'essai que pendant les essais eux-mêmes. Ces observations viennent s'ajouter aux observations de base sur les organismes prévues à la sous-section 4.5.

7.5 Résultats et calculs

Les résultats des essais portant sur des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux options et aux démarches prévues dans les sous-sections 4.6 et 6.6.

L'essai de chacun des échantillons de milieux récepteurs devrait porter au minimum sur dix aliquotes de l'échantillon non dilué et dix aliquotes d'une solution de contrôle. Les résultats de ces essais se limiteraient normalement aux données sur la reproduction et la survie de *C. dubia* obtenues après exposition à un milieu récepteur non dilué pendant 7 ± 1 jours (*cf.* 4.6).

Lorsque les échantillons de milieux récepteurs sont probablement toxiques et qu'on souhaite obtenir des renseignements sur le degré de dilution nécessaire pour permettre la survie et la reproduction normales des daphnies, on devrait effectuer un essai complet en vue de déterminer la CSEO/CMEO ou la CI_p, conformément à la section 4, avec au moins une concentration non diluée (échantillon à 100 %) comme concentration la plus élevée soumise à l'essai.

Certains ensembles d'essais pourraient porter sur une série d'échantillons, comme des eaux de surface provenant d'un certain nombre d'emplacements, chaque échantillon étant soumis à l'essai sans être dilué. Les calculs statistiques et la présentation des résultats de ces essais devraient être conformes aux méthodes indiquées à la sous-section 4.6.

Section 8

Procès-verbal de l'essai

Le procès-verbal de l'essai devrait décrire les matériaux et les méthodes utilisés ainsi que les résultats de l'essai. À partir de ce document, le lecteur devrait être en mesure de savoir si, compte tenu des conditions et des méthodes utilisées, les résultats sont admissibles pour l'utilisation prévue.

On peut citer les méthodes et conditions qui sont communes à une série continue d'essais (p. ex., essais de toxicité courants à des fins de surveillance ou de conformité) et qui sont conformes aux dispositions du présent document; on peut aussi présenter, en annexe, un rapport général définissant le mode opératoire normalisé. Dans les cas où des choix sont possibles, la démarche retenue devrait être précisée. Le rapport général devrait faire état des renseignements méthodologiques énumérés aux sections 8.2 à 8.6. Un rapport particulier énonçant les résultats de l'essai devrait renfermer les renseignements indiqués dans les sections 8.1 et 8.7. Des programmes de surveillance particuliers pourraient exiger la mention de certains éléments d'information dans le procès-verbal de l'essai (p. ex., le mode opératoire et les résultats des essais exigeant un ajustement du pH ou de la dureté de l'eau). Les autres détails concernant la réalisation et les résultats de l'essai qui ne sont pas consignés dans les rapports devraient être versés aux dossiers du laboratoire d'essai, de sorte qu'on puisse obtenir les renseignements voulus si une vérification de l'essai s'avère nécessaire.

8.1 Substance à expérimenter

- Type, source et description de l'échantillon (produit chimique, effluent, élutriat, lixiviat ou milieu récepteur; lieu, méthode et calendrier de prélèvement; détails sur la nature, l'aspect et les propriétés de l'échantillon, ainsi que son volume ou son poids).

- Renseignements sur l'étiquetage ou le codage de la substance à expérimenter.

- Détails sur les modalités de prélèvement, de transport et de stockage des échantillons (p. ex., échantillon instantané, discontinu ou composite, description du contenant et température de l'échantillon à la réception et pendant le stockage).

- Identité des personnes ayant prélevé ou fourni l'échantillon.

- Date et heure du prélèvement de l'échantillon, de sa réception à l'installation d'essai et du début de l'essai définitif.

8.2 Organismes soumis à l'essai

- Espèce et source.

- Description des conditions et des méthodes d'élevage : installations, éclairage, source et qualité de l'eau, prétraitement de l'eau, méthodes d'élevage (y compris la fréquence et le mode de renouvellement de l'eau), méthodes de manipulation des

organismes, intervalle de températures pendant l'élevage, âge de l'élevage, type de nourriture et méthode de préparation, relevés de la valeur nutritive de la nourriture et des contaminants qu'on y sait présents, ration et fréquence d'alimentation.

- Pourcentage estimatif de mortalité dans les élevages individuels pendant les sept jours ayant précédé l'essai.

- Nombre moyen de jeunes vivants qui ont été produits par adulte dans les élevages individuels au cours des sept jours ayant précédé l'essai.

- Nombre de jeunes produits par les génitrices dans leur dernière couvée.

- Observation d'éphippies dans les élevages.

- Âge des organismes au début de l'essai.

8.3 Installations et appareillage

- Nom et adresse du laboratoire d'essai.

- Nom des personnes ayant effectué l'essai.

- Description des systèmes de réglage de l'éclairage et de la température dans l'installation d'essai.

- Description des récipients d'essai et des couvercles (taille, forme et type de matériau).

- Description des méthodes de nettoyage ou de rinçage de l'appareillage.

8.4 Eau de contrôle/de dilution

- Type(s) et source(s) de l'eau utilisée comme eau de contrôle/de dilution.

- Type et quantité de tout produit chimique ajouté à l'eau de contrôle/de dilution.

- Détails sur l'échantillonnage, le prétraitement (ajustement de la température, de la dureté et du pH, dégazage, débit et durée d'aération, etc.) et le stockage de l'eau.

- Variables de la qualité de l'eau mesurées avant l'essai et au début de l'essai.

8.5 Méthode d'essai

- Brève mention de la méthode utilisée, s'il s'agit d'une méthode normalisée (p. ex., conforme au présent document).

- Conception et description de la méthode, si elle est spécialisée (p. ex., renouvellement continu ou à intervalles autres que quotidiens des solutions d'essai), ou si l'on apporte des modifications à une méthode normalisée (p. ex., aération des solutions pendant l'essai).

- Méthode utilisée pour la préparation des solutions mères et des solutions d'essai de produits chimiques.

- Résultats de toute analyse chimique des solutions d'essai et mention des méthodes analytiques utilisées.

- Utilisation d'un essai préalable ou de détermination de l'ordre de grandeur.

- Fréquence et nature des observations effectuées pendant l'essai.

8.6 Conditions de l'essai

- Nombre, concentration, profondeur et volume des solutions d'essai répétées, y compris les solutions de contrôle.
- Nombre d'organismes par solution d'essai et par volume de 15 mL.
- Photopériode, source lumineuse et éclairement à la surface des solutions d'essai.
- Renseignements sur l'aération des solutions d'essai avant l'exposition des daphnies (le cas échéant, débit, durée et mode d'application).
- Description de tout ajustement du pH ou de la dureté des solutions d'essai, y compris la méthode employée et le moment de l'ajustement.
- Description de la source et du type d'aliments utilisés durant l'essai, de la méthode et de la fréquence d'alimentation ainsi que des rations alimentaires.
- Conditions et méthodes de préparation des solutions de produits toxiques de référence, d'exécution de l'essai et de calcul de la CSEO/CMEO ou de la CI_p.
- Résultats de toute mesure chimique des solutions d'essai (p. ex., dureté, alcalinité, conductivité, matières en suspension, concentration du produit chimique à expérimenter, des contaminants ou des produits de dégradation).
- Température, pH, oxygène dissous (mg/L et pourcentage de saturation) et conductivité, d'après les mesures faites dans chaque solution d'essai; dureté totale de l'eau de contrôle/de dilution et de la solution de la plus forte concentration au commencement de l'essai.

8.7 Résultats de l'essai

- Aspect des solutions d'essai et modifications constatées pendant l'essai.
- Mortalité (en pourcentage) et nombre de jeunes par daphnie de première génération dans chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle), selon les données recueillies à chaque période d'observation.
- Résultats de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur (s'il y en a eu un).
- CSEO/CMEO ou CI_p relatives à la mortalité et au taux de reproduction des daphnies de première génération, et tests statistiques appliqués à leur mesure; variation significative minimale, en pourcentage, qui peut être détectée selon ces tests par rapport aux résultats obtenus avec les solutions de contrôle; toute transformation nécessaire des données.
- Toute valeur CL_{50} (et ses limites de confiance à 95 %) qui a été établie, y compris une mention de la méthode statistique utilisée pour les calculs.
- Résultats des essais de toxicité faits avec les produits toxiques de référence dans un délai de 14 jours avant ou après l'essai, et moyenne géométrique (± 2 fois l'écart-type) des résultats obtenus avec les mêmes produits lors d'essais antérieurs faits dans l'installation d'essai.

Références

Abernethy, S.G. et G.F. Westlake. «Guidelines for pH Adjustment of Effluent Samples for Toxicity Testing». Rexdale (Ont.), ministère de l'Environnement de l'Ontario, 1989. 11 p.

Anderson, S.L. et T.J. Norberg-King. «Letter to the Editor. Precision of Short-term Chronic Toxicity Tests in the Real World». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 10, 1991, p. 143-145.

Anon. «North Carolina *Ceriodaphnia* Chronic Effluent Bioassay Procedure», December 1985, Revised December 1986. Raleigh, NC, North Carolina Department of Natural Resources and Community Development, Division of Environmental Management, Water Quality Section, 1986. 10 p. et annexes.

Anon. «*Ceriodaphnia dubia* Survival and Reproduction Test». *Interim Chronic Toxicity Testing Methodologies for Use in the NJPDES Permit Program.* Trenton, NJ, State of New Jersey Department of Environmental Protection, 1989.

APHA, AWWA et WPCF. «Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms». *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th ed. Washington, DC, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, 1989. Part 8000, p. 8-1 - 8-143.

Armstrong, F.A.J. et D.P. Scott. «Photochemical Dechlorination of Water Supply for Fish Tanks with Commercial Water Sterilizers». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, vol. 31, 1974, p. 1881-1885.

Arruda, J. A., G. R. Marzolf et R. T. Faulk. «The Role of Suspended Sediment in the Nutrition of Zooplankton in Turbid Reservoirs». *Ecology*, vol. 65, 1983, p. 1225-1235.

ASTM [American Society For Testing and Materials]. «Proposed New Standard Guide for Conducting Three-brood, Renewal Toxicity Tests with *Ceriodaphnia dubia*», Draft No. 6. Philadelphia, PA, American Society for Testing and Materials, 1988. 79 p.

ASTM. «Standard Guide for Conducting Three-brood, Renewal Toxicity Tests with *Ceriodaphnia dubia*». Report E1295-89. *Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.04, 1989, p. 879-897.

Battelle [Battelle, Columbus Division, Columbus, OH]. «Appendix D, Battelle's Standard Operating Procedure (SOP) for Preparing the Yeast/trout food/Cerophyll Suspension (YTC) Used as a *Ceriodaphnia* Food»; «Appendix E, Battelle's Standard Operating Procedure for Static-renewal Chronic Toxicity Tests with *Ceriodaphnia dubia*»; «Appendix F, Battelle's Standard Operating Procedure (SOP) for Culturing *Ceriodaphnia dubia*». *Laboratory Evaluation of Seven-day Fathead Minnow and Ceriodaphnia Chronic Toxicity Tests.* API Publication No. 4442. Washington, DC, American

Petroleum Institute, Health and Environmental Sciences Department, 1986.

Battelle. «Standard Operating Procedure for Static-renewal Short-term Chronic Effluent Toxicity Tests with *Ceriodaphnia dubia*». Report EEF-E-20-01. Columbus, OH, Battelle, Columbus Division, 1987. 6 p.

Battelle. «Appendix A, Battelle's Standard Operating Procedure (SOP) for Culturing *Ceriodaphnia dubia*»; «Appendix B, Battelle's Standard Operating Procedure (SOP) for Yeast/trout food/Cerophyll (YTC) Preparation»; «Appendix D, Battelle's Standard Operating Procedure (SOP) for Static-renewal Chronic Toxicity Tests with Ceriodaphnia dubia». *Effects of Food and Water Quality on Culturing and Toxicity Testing of* Ceriodaphnia dubia. EPRI Report EA-5820, Project 2368-2. Palo Alto, CA, Electric Power Research Institute, Ecological Studies Program, 1988.

Berner, D.B. «Taxonomy of *Ceriodaphnia* (Crustacea: Cladocera) in U.S. Environmental Protection Agency Cultures». Report EPA/600/4-86/032. Cincinnati, OH, Environmental Protection Agency, 1986. 34 p.

Billington, J.W., G.-L. Huang, F. Szeto, W.Y. Shiu et D. MacKay. «Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: I. Single-component Systems». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 7, 1988, p. 117-124.

Bouck, G.R. «Gasometer: An Inexpensive Device for Continuous Monitoring of Dissolved Gases and Supersaturation». *Transactions of the American Fisheries Society*, vol. 111, 1982, p. 505-516.

Buikema, A.L. Jr. «Some Effects of Light on the Growth, Molting, Reproduction and Survival of the Cladoceran, *Daphnia pulex*». *Hydrobiologia*, vol. 41, 1973, p. 391-418.

Buikema, A.L. Jr., J.G. Geiger et D.R. Lee. «Daphnia Toxicity Tests». *Aquatic Invertebrate Bioassays*. A.L. Buikema Jr. et J. Cairns (éd.). Philadelphia, PA, American Society for Testing and Materials, 1980, p. 48-69.

Carpenter, S.R., J.F. Kitchell et J.R. Hodgson. «Cascading Trophic Interactions and Lake Productivity». *BioScience*, vol. 35, nº 10, 1985, p. 634-647.

CCMRE [Conseil canadien des ministres des Ressources et de l'Environnement]. «Recommandations pour la qualité des eaux au Canada». Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1987.

Cooney, J.D. et G.M. DeGraeve. *Laboratory Evaluation of Seven-day Fathead Minnow and Ceriodaphnia Chronic Toxicity Tests*. API Publication No. 4442. Washington, DC, American Petroleum Institute, Health and Environmental Sciences Department, 1986.

Cooney, J.D., G.M. DeGraeve, E.L. Moore, W.D. Palmer et T.L. Pollock. *Effects of Food and Water Quality on Culturing and Toxicity Testing of* Ceriodaphnia dubia. EPRI Report EA-5820. Palo Alto, CA, Electric Power Research Institute, Ecological Studies Program, 1988.

Cowgill, U.M. «Critical Analysis of Factors Affecting the Sensitivity of Zooplankton and the Reproducibility of Toxicity Test Results». *Water Research*, vol. 21, 1987, p. 1453-1462.

Cowgill, U.M. «Nutritional Considerations in Toxicity Testing: Invertebrate Nutrition (*Daphnia, Ceriodaphnia*)». *Nutritional Considerations in Toxicity Testing*. R.P. Lanno (éd.). Compte rendu du cours abrégé offert à la 10e assemblée annuelle de la *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, Toronto, 29 octobre 1989, p. 4-15.

Cowgill, U.M., I.T. Takahashi et S.L. Applegath. «A Comparison of the Effect of Four Benchmark Chemicals on *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia/affinis* Tested at Two Different Temperatures». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 4, 1985, p. 415-422.

Cowgill, U.M., D.P. Milazzo et C.K. Meagher. «New Diet for *Ceriodaphnia dubia*». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 41, 1988, p. 304-309.

Cowgill, U.M. et D.P. Milazzo. «New Approach to the Seven-day *Ceriodaphnia dubia* Test with Additional Comments Pertaining to the Same Test for *Daphnia magna*». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 42, 1989, p. 749-753.

DeGraeve, G.M. et J.D. Cooney. «*Ceriodaphnia*: An Update on Effluent Toxicity Testing and Research Needs». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 6, 1987, p. 331-333.

DeGraeve, G.M., J.D. Cooney, B.H. Marsh, T.L. Pollock et N.G. Reichenbach. «Precision of the EPA Seven-day *Ceriodaphnia dubia* Survival and Reproduction Test: Intra- and Interlaboratory Study». Report EPRI EN-6469. Palo Alto, CA, Electric Power Research Institute, Ecological Studies Program, 1989.

Eagleson, K.W., D.L. Lenat, L.W. Ausley et F.B. Winborne. «Comparison of Measured Instream Biological Responses with Responses Predicted Using the *Ceriodaphnia dubia* Chronic Toxicity Test». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 9, 1990, p. 1019-1028.

Environnement Canada. «Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur *Daphnia* spp.». Rapport SPE 1/RM/11. Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1990 (1990a).

Environnement Canada. «Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence». Rapport 1/RM/12. Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1990 (1990b).

EPA [Environmental Protection Agency]. «Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms». Report EPA/600/4-85/014. W.B. Horning et C.I. Weber (éd). Cincinnati, OH, Environmental Protection Agency, 1985. 162 p. (1985a).

EPA. «Acute Toxicity Test for Freshwater Invertebrates». Report EPA-540/9-85/005. Washington, DC, Environmental Protection Agency,

Hazard Evaluation Division, Office of Pesticide Programs, 1985 (1985b).

EPA. «Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms», 2nd ed. Report EPA/600/4-89/001, prepared by C.I. Weber, W.H. Peltier, T.J. Norberg-King, W.B. Horning, F.A. Kessler, J.R. Menkedick, T.W. Neiheisel, P.A. Lewis, D.J. Klemm, W.H. Pickering, E.L. Robinson, J. Lazorchak, L.J. Wymer et R.W. Freyberg. Cincinnati, OH, Environmental Protection Agency, 1989. 248 p.

GITA [Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique]. «Sublethal Testing Procedures for *Daphnia* sp./ *Ceriodaphnia* sp.». Appendix 7A, Part H, «Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environmental Protection», par G. Sergy. Edmonton (Alb.), Environnement Canada, 1987 (1986).

Gulley, D.D., A.M. Boelter et H.L. Bergman. «TOXSTAT Release 3.0». Laramie, WY, University of Wyoming, 1989. 18 p. et disquette d'ordinateur. [Adresse postale : Department of Zoology and Physiology, University of Wyoming, Laramie, WY 82071, U.S.A. Téléphone : (307) 745-8504]

Hall, W.S. et L.W. Hall. «Toxicity of Alum Sludge to *Ceriodaphnia dubia* and *Pimephales promelas*». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 42, nº 5, 1989, p. 791-798.

Hamilton, M.A., R.C. Russo et R.V. Thurston. «Trimmed Spearman-Karber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays». *Environmental Science and Technology*, vol. 11, 1977, p. 714-719.

Hubert, J.J. «PROBIT2: A Microcomputer Program for Probit Analysis». Guelph (Ont.), University of Guelph, Department of Mathematics and Statistics, 1987.

INRE [Institut national de recherche sur les eaux]. «*Ceriodaphnia reticulata* Seven-day Survival and Reproduction Test for Screening Chronic Toxicity in Environment Samples». Manuel inédit, par B.J. Dutka et S.S. Rao. Burlington (Ont.), Institut national de recherche sur les eaux, 1988.

ISO [Organisation internationale de normalisation]. «Qualité de l'eau - Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)», 1re éd. Rapport nº ISO 6341-1982(F). Genève, Organisation internationale de normalisation, 1982.

Keating, K.I. «A System of Defined (*sensu stricto*) Media for Daphnid (Cladocera) Culture». *Water Research*, vol. 19, 1985, p. 73-78.

Keating, K.I., P.B. Caffrey et K.A. Schultz. «Inherent Problems in Reconstituted Water». *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*, 12th Volume. U.M. Cowgill et L.R. Williams (éd). ASTM STP 1027. Philadelphia, PA, American Society for Testing and Materials, 1989, p. 367-378.

Litchfield, J.T. «A Method for Rapid Graphic Solution of Time-percent Effect Curves». *Journal of*

Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 97, 1949, p. 399-408.

Masters, J.A., M.A. Lewis, D.H. Davidson et R.D. Bruce. «Validation of a Four-day *Ceriodaphnia* Toxicity Test and Statistical Considerations in Data Analysis». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 10, 1991, p. 47-55.

McCabe, G.D. et W. J. O'Brien. «The Effects of Suspended Silt on Feeding and Reproduction of *Daphnia pulex*». *American Midland Naturalist*, vol. 110, 1983, p. 324-337.

McCaffrey, L. «The Role of Toxicity Testing in Prosecutions Under Section 14 (1)(a) of the *Environmental Protection Act, 1971* and Section 32 (1) of the *Ontario Water Resources Act*». *Proceedings of the Fifth Annual Aquatic Toxicity Workshop, Hamilton, Ontario, November 7-9, 1978.* Rapport technique du Service des pêches et des sciences de la mer nº 862. Ottawa, Pêches et Environnement Canada, 1979, p. 15-22.

McNaught, D.C. et D.I. Mount. «Appropriate Durations and Measures for *Ceriodaphnia* Toxicity Tests». *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium.* R.C. Bahner et D.J. Hansen (éd). ASTM STP 891. Philadelphia, PA, American Society for Testing and Materials, 1985, p. 375-381.

Melville, G.E. et D. Richert. «A Summary of the Effects of Two Reconstituted Waters on Aspects of the Demographics of *Ceriodaphnia dubia*». *Comptes rendus du 15e Colloque sur la toxicologie aquatique, Montréal, Québec, 28-30 novembre 1988.* Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques nº 1714. Ottawa, Pêches et Océans Canada, 1989.

Mount, D.I. et L. Anderson-Carnahan. «Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase I. Toxicity Characterization Procedures». Report EPA-600/3-88/034. Duluth, MN, Environmental Protection Agency, 1988.

Mount, D.I. et T.J. Norberg. «A Seven-day Life-cycle Cladoceran Toxicity Test». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 3, 1984, p. 425-434.

Mount, D.I. et T.J. Norberg-King. «Validity of Effluent and Ambient Toxicity Tests for Predicting Biological Impact, Kanawha River, Charleston, West Virginia». Report EPA/600/3-86/006. Duluth, MN, Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, 1986.

Mount, D.I., N.A. Thomas, T.J. Norberg, M.T. Barbour, T.H. Roush et W.F. Brandes. «Effluent and Ambient Toxicity Testing and Instream Community Response on the Ottawa River, Lima, Ohio». Report EPA/600/3-84/080. Duluth, MN, Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, 1984.

Mount, D.I., A.E. Steen et T.J. Norberg-King (éd.). «Validity of Effluent and Ambient Toxicity Testing for Predicting Biological Impact on Five Mile Creek, Birmingham, Alabama». Report EPA/600/8-85/015. Duluth, MN, Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, 1985.

Mount, D.I., A.E. Steen et T.J. Norberg-King. «Validity of Effluent and Ambient Toxicity Tests for Predicting Biological Impact, Back River, Baltimore Harbor, Maryland». Report EPA/600/8-86/001. Duluth, MN, Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, 1986.

Norberg-King, T. «An Interpolation Estimate for Chronic Toxicity: The ICp Approach». Unpublished manuscript. Duluth, MN, Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, 1988. 12 p.

Norberg-King, T. «Culturing of *Ceriodaphnia dubia*: Supplemental Report for Video Training Tape». Report EPA/505/8-89/002a. Washington, DC, Environmental Protection Agency, Office of Water Enforcement and Permits, 1989. 33 p.

Norberg-King, T.J. et D.I. Mount (éd.). «Validity of Effluent and Ambient Toxicity Tests for Predicting Biological Impact, Skeleton Creek, Enid, Oklahoma». Report EPA/600/8-86/002. Duluth, MN, Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, 1986.

Pennak, R.W. *Freshwater Invertebrates of the United States*, 2nd ed. New York, NY, John Wiley & Sons, 1978.

Robinson, M. «The Effects of Suspended Material on the Reproductive Rate of *Daphnia magna*». *Publications of the Institute of Marine Science, University of Texas*, vol. 4, 1978, p. 265-277.

Rocchini, R.J., M.J.R. Clark, A.J. Jordan, S. Horvath, D.J. McLeay, J.A. Servizi, A. Sholund, H.J. Singleton, R.G. Watts et R.H. Young. «Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish». Victoria (C.-B.), ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, 1982. 18 p.

Sergy, G. «Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environmental Protection». Edmonton (Alb.), Environnement Canada, juillet 1987.

Servizi, J.A. et R.W. Gordon. «Detoxification of TMP and CTMP Effluents Alternating in a Pilot-scale Aerated Lagoon». *Pulp & Paper Canada*, vol. 87, nº 11, 1986, p. 404-409.

Shiu, W.Y., A. Maijanen, A.L.Y. Ng et D. Mackay. «Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: II. Multicomponent Systems - Hydrocarbon Mixtures and Petroleum Products». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 7, 1988, p. 125-137.

Sprague, J.B. «Measurement of Pollutant Toxicity to Fish. I. Bioassay Methods for Acute Toxicity». *Water Research*, vol. 3, 1969, p. 793-821.

Stephan, C.E. «Methods for Calculating an LC50». *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. F.L. Mayer et J.L. Hamelink (éd.). ASTM STP 634. Philadelphia, PA, American Society for Testing and Materials, 1977, p. 65-84.

Suter, G.W. II, A.E. Rosen, E. Linder et D.F. Parkhurst. «Endpoints for Responses of Fish to Chronic Toxic Exposures». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 6, 1987, p. 793-809.

Annexe A

Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique

Gouvernement fédéral*

P. Wells (président actuel)
PE, Dartmouth (N.-É.)

R. McCubbin
St. John's (T.-N.)

K. Doe
Dartmouth (N.-É.)

W. Parker
Dartmouth (N.-É.)

N. Bermingham
Longueuil (Québec)

C. Blaise
Longueuil (Québec)

G. Elliott
Edmonton (Alberta)

R. Watts
North Vancouver (C.-B.)

K. Day
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ontario)

B. Dutka
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ontario)

L. Porebski
Bureau de la gestion des déchets
Ottawa (Ontario)

D. MacGregor
Direction des produits chimiques commerciaux
Ottawa (Ontario)

R. Scroggins
Direction des programmes industriels
Ottawa (Ontario)

G. Sergy
Direction du développement technologique
Edmonton (Alberta)

E. Watt
Direction de la qualité des eaux
Ottawa (Ontario)

Gouvernements provinciaux

C. Bastien
Ministère de l'Environnement du Québec
Sainte-Foy (Québec)

G. Westlake
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ontario)

W. Young
Ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique du Manitoba
Winnipeg (Manitoba)

K. Lauten
Ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique de la Saskatchewan
Regina (Saskatchewan)

J. Somers
Ministère de l'Environnement de l'Alberta
Vegreville (Alberta)

S. Horvath
Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique
Vancouver (C.-B.)

G. van Aggelen
Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique
North Vancouver (C.-B.)

---

* Environnement Canada, Conservation et Protection, au mois de mars 1991.

Annexe B

Adresses de l'Administration centrale et des bureaux régionaux de Conservation et Protection

Administration centrale
351, boulevard Saint-Joseph
Place Vincent-Massey
Hull (Québec)
K1A 0H3

Région de l'Atlantique*
15e étage, Queen Square
45, promenade Alderney
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)
B2Y 2N6

Région du Québec
1141, route de l'Église
C.P. 10100
Sainte-Foy (Québec)
G1V 4H5

Région de l'Ontario
25, avenue St. Clair est, 6e étage
Toronto (Ontario)
M4T 1M2

Région de l'Ouest et du Nord
Twin Atria no 2, pièce 210
4999, 98e avenue
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

Région du Pacifique et du Yukon**
224, rue Esplanade
North Vancouver (C.-B.)
V7M 3J7

---

* Les programmes BOOTSTRP et TOXSTAT peuvent être reproduits sur une disquette formatée de 13 cm compatible IBM fournie par l'utilisateur. Pour les obtenir, communiquer avec la Division des laboratoires à cette adresse.

** Un programme informatique en BASIC pour le calcul de la CL_{50} peut être reproduit sur une disquette formatée de 13 cm compatible IBM fournie par l'utilisateur. Pour l'obtenir, communiquer avec le Laboratoire de toxicité aquatique à cette adresse.

Annexe C

Écarts de méthodologie pour l'exécution d'essais de toxicité chronique sur *Ceriodaphnia* spp.*

1. Substance à expérimenter et type d'essai

Document[a]	Substance à expérimenter[b]	Type d'essai	Durée de l'essai
EPA, 1985a	effl., MR	RP[c]	7 d
Anon., 1986	effl.	RP	7 d
Battelle, 1986[d]	effl., PC	RP	7 d
Battelle, 1987	effl.	RP	7 d
Battelle, 1988	NI[e]	RP	7 d
ASTM, 1988	effl., PC (lix., séd., MR)	RP	7 d[f]
INRE, 1988	effl., lix., séd.	RP	7 d
Anon., 1989	effl.	RP	3 couvées[f,g]
EPA, 1989	effl., MR	RP	3 couvées[g,h]

a Les noms complets des organismes sont donnés dans les références.
b effl. = effluent lix. = lixiviat
séd. = sédiments MR = milieu récepteur
PC = produit chimique
c RP = à renouvellement périodique.
d Nous donnons trois versions de la méthode de Battelle parce qu'elles sont toutes récentes, que les chercheurs peuvent retrouver n'importe laquelle et qu'on y observe une certaine progression.
e NI = non indiqué.
f Huit jours si la troisième couvée n'est pas produite en sept jours.
g Jusqu'à ce que 60 % des femelles témoins aient eu trois couvées.
h Pourrait prendre plus ou moins de sept jours.

* D'après les documents de méthodologie canadiens et américains dont disposaient les auteurs au mois d'août 1989.

2. Organisme soumis à l'essai

Document	Espèce	Âge
EPA, 1985a	*C. dubia*	2 à 24 h, nées à intervalles de moins de 4 h
Anon., 1986	*C. dubia/affinis*	2 à 24 h, nées à intervalles de moins de 4 h
Battelle, 1986	*C. dubia*	<24 h
Battelle, 1987	*C. dubia*	<24 h
Battelle, 1988	*C. dubia*	<24 h
ASTM, 1988	*C. dubia*	<12 h, nées à intervalles de moins de 4 h[a]
INRE, 1988	*C. reticulata*	≤2 h
Anon., 1989	*C. dubia*	<24 h, nées à intervalles de moins de 8 h
EPA, 1989	*C. dubia*	<24 h, nées à intervalles de moins de 8 h

a Issues de la troisième couvée ou d'une couvée ultérieure, avec au moins de six à huit jeunes dans la couvée précédente.

3. Conditions d'élevage et d'acclimatation

Document	Eau	Température (°C)	Dureté	Aération
EPA, 1985a	ER[a] (EN[b], ED[c])	25 ± 2	80 - 100	au besoin, OD ≥5
Anon., 1986	«selon EPA, 1985a»	.....	.....	.....
Battelle, 1986	EN	25 ± 2	100	aucune
Battelle, 1987	ER	25 ± 2	NI	NI
Battelle, 1988	ER[d]	25 ± 2	160 - 180	aucune
ASTM, 1988	semblable à l'eau de dilution	25	NI	NI
INRE, 1988	ED (EN)	25 ± 1	NI	NI
Anon., 1989	«selon EPA, 1989»	.....	.....	.....
EPA, 1989	ER	25 ± 1	80 - 100	NI

a ER = eau reconstituée.
b EN = eau naturelle, souterraine ou de surface, non contaminée.
c ED = eau municipale déchlorée.
d Avec ajout d'un inoculum bactérien.

4. Conditions d'éclairage pendant l'élevage

Document	Photopériode (lumière/obscurité)	Éclairement	Type	Période de transition
EPA, 1985a	16 h / 8 h (ou régime normal du laboratoire)	NI	NI	NI
Anon., 1986	«selon EPA, 1985a»			
Battelle, 1986	16 h / 8 h	540 - 1 607 lux	Fl[a]	NI
Battelle, 1987	NI	NI	NI	NI
Battelle, 1988	16 h / 8 h	540 - 1 607 lux	Fl	NI
ASTM, 1988	16 h / 8 h	≤600 lux	NI	15 - 30 min[b]
INRE, 1988	NI	NI	NI	NI
Anon., 1989	«selon EPA, 1989»			
EPA, 1989	16 h / 8 h	NI	NI	NI

a Fluorescent avec indice de rendu des couleurs ≥90.
b Souhaitable pour réduire le stress causé par un changement brusque.

5. Conditions d'alimentation pendant l'élevage et l'essai

Document	Aliment	Fréquence pendant l'élevage	Fréquence pendant l'essai (jours après le début)
EPA, 1985a	YCT[a]	tous les jours	tous les jours
Anon., 1986	«selon EPA, 1985a»		
Battelle, 1986	algue[b] + YCT	3 fois par semaine	0, 2, 4, ou 0, 3, 5
Battelle, 1987	algue[b] + YCT	3 fois par semaine	tous les jours
Battelle, 1988	algue[b] + YCT	3 fois par semaine	0, 2, 4, ou 0, 3, 5
ASTM, 1988	NI[c]	régulièrement	tous les jours (souhaitable)
INRE, 1988	algue[d] + levure	tous les jours	0, 2, 4
Anon., 1989	artémias[e]	NI	deux fois par jour
EPA, 1989	algue[b] + YCT	tous les jours	tous les jours

a YCT = moulée de levure, de Cerophyll^{MC} (feuilles de plantes séchées) et de truite (*Yeast, Cerophyll, Trout*).
b *Selenastrum capricornutum*.
c Comme on l'a vérifié, mélanges de diverses algues, de levure, de moulée de truite et de Cerophyll^{MC}.
d *Scenedesmus* sp.
e Nauplius frais éclos.

6. Conditions de l'essai

Document	Contenant	Volume d'essai (mL)	Nombre de daphnies par contenant	Nombre de répétitions
EPA, 1985a	BVB[a] ou gobelet de plastique de 30 mL	15	1	10
Anon., 1986	«selon EPA, 1985a»	15	1	12
Battelle, 1986	BVB de 30 mL	15	1	10
Battelle, 1987	BVB de 30 mL	15	1	10
Battelle, 1988	BVB de 30 mL	15	1	10
ASTM, 1988	contenant d'au moins 30 mL[b]	≥15	1	≥10
INRE, 1988	gobelet de plastique ou becher de 30 mL	10	1	4 - 6
Anon., 1989	30 mL (couvert)	15	1	≥10
EPA, 1989	BVB ou gobelet de plastique de 30 mL	15	1	10

a Becher de verre borosilicaté.
b En verre, en acier inoxydable de type 316 ou en plastique fluorocarboné.

7. Caractéristiques de l'eau de contrôle/de dilution

Document	Type d'eau[a]	Dureté (mg/L)	pH	OD[b] minimum	Fréquence de renouvellement (jours après le début)
EPA, 1985a	ER, EN, MR (ED[c])	80 - 100[d]	NI	aérer au besoin	tous les jours
Anon., 1986	«selon EPA, 1985a»	.....			2, 5
Battelle, 1986	semblable à l'eau d'élevage	.....	NI		2, 4 ou tous les jours
Battelle, 1987	ER, MR	NI	NI	aérer au besoin	tous les jours
Battelle, 1988	ER	160 - 180	7,6 - 8,5	NI	2, 4 ou 2, 5
ASTM, 1988	ER[e], EN, MR (ED[c])	NI[e]	NI	90 - 100 %	tous les jours
INRE, 1988	ED	NI	NI	NI	2, 4
Anon., 1989	EN, ER, EMD[f] ≤20 %	NI	NI	aérer ≥24 h	tous les jours
EPA, 1989	ER[g], EN, MR, ED	NI[g]	NI	aérer au besoin	tous les jours

a ER = eau reconstituée EN = eau naturelle, souterraine ou de surface, non contaminée
MR = milieu récepteur ED = eau municipale déchlorée
EMD = eau minérale diluée
b Oxygène dissous.
c «En dernier ressort».
d S'il s'agit d'eau reconstituée. Semblable à celle du milieu récepteur si celui-ci est utilisé pour les dilutions.
e Préparée selon la norme nº E729 de l'ASTM. On peut utiliser de l'eau reconstituée douce ou dure. Il «pourrait être souhaitable» d'y ajouter du sélénium ou de la vitamine B_{12}.
f Il est recommandé d'ajouter du sélénium et de la vitamine B_{12} à l'eau de dilution.
g Si l'on emploie de l'eau reconstituée, ils est recommandé qu'elle soit modérément dure (de 80 à 100 mg/L).

8. Température, aération, oxygène dissous et ajustement du pH pendant l'essai

Document	Température de l'eau (°C)	Aération	OD minimum avant l'essai	Ajustement du pH
EPA, 1985a	25 ± 1	aucune[a]	NI («bas»)	NI
Anon., 1986	25 ± 1	aucune?	5,0 mg/L	NI
Battelle, 1986	25 ± 2	aucune	NI	NI
Battelle, 1987	25 ± 2	aucune	NI	oui si ≤6,0, ≥9,0
Battelle, 1988	25 ± 2	aucune	NI	NI
ASTM, 1988	25 ± 1	légère au besoin	40 %[b]	NI
INRE, 1988	25 ± 1	aucune	NI	NI
Anon., 1989	25 ± 1	aucune	NI	NI
EPA, 1989	25 ± 1	aucune	NI	NI

a Aérer l'échantillon avant l'essai, au besoin.
b Si l'on a 40 % de saturation, renouveler les solutions d'essai plus fréquemment. Dans chaque contenant, la moyenne pondérée en fonction du temps doit être d'au moins 50 % de saturation.

9. Conditions d'éclairage pendant l'essai

Document	Photopériode (lumière/ obscurité)	Éclairement	Type	Période de transition
EPA, 1985a	16 h / 8 h	ambiant (10 - 20 $\mu E/m^2 \cdot s$)	NI	NI
Anon., 1986	16 h / 8 h	«selon EPA, 1985a»		
Battelle, 1986	16 h / 8 h	540 - 1 607 lux	Fl[a]	NI
Battelle, 1987	16 h / 8 h	ambiant (323 - 1 076 lux)	Fl	NI
Battelle, 1988	16 h / 8 h	540 - 1 607 lux	Fl[a]	NI
ASTM, 1988	16 h / 8 h	NI	NI	15 - 30 min[b]
INRE, 1988	NI	NI	NI	NI
Anon., 1989	16 h / 8 h	«selon EPA, 1989»		
EPA, 1989	16 h / 8 h	ambiant (10 - 20 $\mu E/m^2 \cdot s$)	NI	NI

a Fluorescent avec indice de rendu des couleurs ≥90.
b Souhaitable pour réduire le stress causé par un changement brusque.

10. Surveillance de la qualité de l'eau pendant l'essai

Document	Variable[a]	Fréquence (jours après le début)
EPA, 1985a	OD pH T CS DT AT	tous les jours[b]
Anon., 1986	OD pH T	0 2 5 7
Battelle, 1986	OD pH T CS	0 2 4 7, ou 0 3 5 7, ou tous les jours
Battelle, 1987	OD pH T CS DT AT	0 + tous les jours
Battelle, 1988	OD pH T CS	0 2 4 7
	DT AT	0 2 4
ASTM, 1988	OD pH T	0 + 7 ou plus souvent[c]
INRE, 1988	pH	0 7
Anon., 1989	«selon EPA, 1989»	
EPA, 1989	OD pH T	tous les jours[d]
	CS DT AT	dans les nouveaux échantillons[e]

a OD = oxygène dissous; pH = concentration d'ions d'hydrogène; T = température; CS = conductivité spécifique; DT = dureté totale; AT = alcalinité totale

b OD : au début et à la fin de la journée dans des récipients représentatifs. Dureté et alcalinité : dans la solution de contrôle et la concentration la plus élevée.

c OD : dans les eaux d'essai usées de la solution de contrôle et des concentrations supérieure, moyenne et inférieure, au moins au début, au milieu et à la fin de l'essai. Alcalinité et pH : au moins une fois dans l'eau fraîche et l'eau usée de la concentration la plus élevée.

d OD et pH : au début et à la fin de la journée dans des échantillons représentatifs.

e Dans chaque nouvel échantillon (100 %) et dans la solution de contrôle.

11. Observations biologiques pendant l'essai

Document	Variable		Fréquence (jours après le début)
EPA, 1985a	mortalité[a],	nombre de jeunes vivants	tous les jours
Anon., 1986	mortalité,	nombre de jeunes vivants	2 5 7
Battelle, 1986	mortalité,	nombre de jeunes	2 4 7 ou 3 5 7
Battelle, 1987	mortalité,	nombre de jeunes	2 4 7 ou 3 5 7
Battelle, 1988	mortalité,	nombre de jeunes	2 4 7 ou 3 5 7
ASTM, 1988	mortalité,	nombre de jeunes vivants, comportement	tous les jours[b]
	(taille des femelles)		7 (facultatif)
INRE, 1988		nombre de jeunes	2 4 7
Anon., 1989	mortalité,	nombre de jeunes vivants	tous les jours
EPA, 1989	mortalité,	nombre de jeunes vivants	tous les jours

a Mortalité des femelles adultes de première génération et des jeunes.

b Ou au moins après chacune des trois couvées produites pendant l'essai.

12. Résultat(s) de l'essai (après sept jours, sauf indication contraire)

Document	Résultat(s)	Critère
EPA, 1985a	CSEO, CMEO[a]	différence significative par rapport aux témoins pour la mortalité, nombre de jeunes vivants[b]
Anon., 1986	réussite/échec, mortalité	≥20% dans toute concentration
	réussite/échec, nombre de jeunes	différence significative par rapport aux témoins
	CSEO pour la réduction du nombre de jeunes	NI
Battelle, 1986	NI	mortalité, nombre de jeunes
Battelle, 1987	CSEO, mortalité, nombre de jeunes	différence significative par rapport aux témoins
Battelle, 1988	NI	mortalité, nombre de jeunes
ASTM, 1988	CSEO, mortalité, nombre de jeunes	différence significative par rapport aux témoins[c]
	CSEO, taille finale des adultes	différence significative par rapport aux témoins
INRE, 1988	CI_{50}a pour la réduction du nombre de jeunes	nombre dans la concentration/nombre chez les témoins
Anon., 1989	«selon EPA, 1989»	
EPA, 1989	CSEO, CMEO[a]	différence significative par rapport aux témoins pour la mortalité, nombre de jeunes vivants[b]
	CL_5, CL_{10}, CL_{50}	mortalité, femelles adultes[d]
	CI_{25}, CI_{50}a	mortalité, nombre de jeunes vivants[d]

a CSEO = concentration sans effet observé
CMEO = concentration minimale avec effet observé
CI_{50} = concentration inhibitrice 50 (c.-à-d. causant une réduction de 50% du nombre de jeunes)

b On compare les nombres de jeunes vivants pour les concentrations où la mortalité ne diffère pas de façon significative de celle des témoins. On calcule le nombre moyen pour chaque femelle (jusqu'à sa mort le cas échéant).

c Fondé sur un essai de huit jours, si la troisième couvée n'est pas produite en sept jours. Un autre critère possible est la concentration causant une réduction précise par rapport au rendement des témoins.

d Déterminés par une technique d'estimation ponctuelle (p. ex., des probits, de la moyenne mobile ou binomiale).

13. Validité de l'essai

Document	Mortalité maximale admise chez les témoins	Reproduction acceptable chez les témoins (nombre de jeunes)
EPA, 1985a	NI	NI
Anon., 1986	20%	>15 par femelle en sept jours, abstraction faite des cas de mortalité
Battelle, 1986	20%	≥3 couvées, ou >15 par femelle en sept jours
Battelle, 1987	NI	NI
Battelle, 1988	NI	NI
ASTM, 1988	20%	≥15 par femelle en trois couvées et en huit jours au maximum, sans éphippies
INRE, 1988	NI	NI
Anon., 1989	20%	«selon ASTM, 1988»
EPA, 1989	20%	≥15 par femelle survivante

Annexe D

Méthode de préparation de l'YCT et de la nourriture à base d'algues pour les élevages de *C. dubia**

Préparation de moulée de truite digérée**

1. La préparation de la moulée de truite nécessite une semaine. Utiliser des boulettes de purée de truite «de première» (*starter*) ou de catégorie n° 1.

2. Ajouter 5,0 g de boulettes de purée de truite à 1 L d'eau désionisée (Milli-Q^MC ou l'équivalent). Bien combiner dans un mélangeur et verser dans un appareil à décantation de 2 L. Faire digérer avant l'utilisation en assurant une aération continue à partir du fond du contenant pendant une semaine, à la température ambiante du laboratoire. L'eau perdue par évaporation devrait être remplacée pendant la digestion. En raison de l'odeur nauséabonde qui se dégage généralement pendant la digestion, le réservoir devrait être déposé dans une hotte ou un autre endroit isolé et bien aéré.

3. À la fin de la période de digestion, déposer la moulée dans un réfrigérateur et la laisser décanter pendant au moins 1 h. Filtrer le surnageant grâce à un tamis à mailles fines (p. ex., Nitex^MC, 110 mesh), et le combiner à des volumes égaux de surnageant des préparations de Cerophyll^MC et de levure (*cf.* ci-dessous). On peut utiliser le surnageant à l'état frais ou le congeler jusqu'au moment de son utilisation. Jeter les sédiments.

Préparation de levure

1. Ajouter 5,0 g de levure sèche, par exemple de marque Fleischmann's^MC, à 1 L d'eau désionisée.

2. Remuer avec un agitateur magnétique, secouer vigoureusement à la main ou combiner dans un mélangeur à vitesse faible, jusqu'à ce que la levure soit bien dispersée.

3. Combiner immédiatement la levure en suspension (ne pas la laisser décanter) avec des volumes égaux de surnageant des préparations de moulée de truite (*cf.* ci-dessus) et de Cerophyll (*cf.* ci-dessous). Jeter les quantités inutilisées.

Préparation de Cerophyll (feuilles de céréales séchées en poudre)

1. Déposer dans un mélangeur 5,0 g de Cerophyll ou de feuilles de céréales

---

* Extrait de EPA, 1989.

** Des chercheurs de l'*Environmental Monitoring Systems Laboratory* de l'EPA à Cincinnati (OH) recommandent l'usage de la nourriture pour poissons tropicaux Tetra-min^MC, qui est disponible dans le commerce, comme substitut de la moulée de truite (J.M. Lazorchak et P.A. Lewis, communication personnelle, 1991).

séchées en poudre*. Les feuilles de luzerne séchées en poudre qu'on peut se procurer dans les magasins d'aliments naturels représentent, d'après l'expérience, un substitut acceptable des feuilles de céréales.

2. Ajouter 1 L d'eau désionisée.

3. Mélanger à grande vitesse pendant 5 min ou agiter pendant la nuit à vitesse moyenne sur une plaque à agitateur magnétique.

4. Si l'on utilise un mélangeur pour suspendre la substance, déposer le mélange dans un réfrigérateur pendant la nuit pour le laisser décanter. Si l'on utilise un agitateur magnétique, laisser le mélange décanter pendant 1 h. Décanter le surnageant et le combiner avec des volumes égaux de surnageant des préparations de moulée de truite et de levure. Jeter les quantités inutilisées.

Préparation de l'YCT combinée

1. Mélanger des volumes égaux (environ 300 mL) des trois aliments décrits ci-dessus.

2. Placer des aliquotes du mélange dans de petites bouteilles de plastique à bouchon vissé (de 50 à 100 mL) et faire congeler jusqu'à utilisation.

3. On peut utiliser immédiatement les aliments fraîchement préparés; on peut aussi les congeler jusqu'à ce qu'on en ait besoin. Les aliments dégelés doivent être conservés au réfrigérateur entre les utilisations, pendant une durée maximale de deux semaines.

4. Il est recommandable de mesurer le poids à sec des solides dans chaque lot d'YCT avant de l'utiliser. La nourriture devrait renfermer de 1,7 à 1,9 g de solides par litre. Les élevages et les solutions d'essai devraient renfermer de 12 à 13 mg de solides par litre.

Préparation de la nourriture à base d'algues (*Selenastrum*)

A. Milieu de culture des algues

1. Préparer cinq solutions nutritives mères à partir des produits chimiques de qualité «réactif» énumérés au tableau D.1.

2. Ajouter 1 mL de chaque solution mère, selon l'ordre indiqué au tableau D.1, à environ 900 mL d'eau désionisée. Bien mélanger après chaque addition. Compléter à 1 L, bien mélanger et ajuster le pH pour qu'il s'établisse à 7,5 ± 0,1, au moyen d'une solution décinormale de NaOH ou de HCl, selon le cas. La concentration définitive de macronutriments et de micronutriments dans le milieu de culture est indiquée au tableau D.2.

3. Filtrer immédiatement le milieu à pH ajusté à l'aide d'une membrane dont le diamètre des pores est égal à 0,45 µg, sous un vide d'au plus 380 mm de mercure ou à une pression d'au plus une demi-atmosphère. Laver le filtre avec 500 mL d'eau désionisée avant de l'utiliser.

---

* Offertes sous l'appellation «Cereal Leaves» par Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, (800) 325-3010, et sous la marque Cerophyll[MC] par Ward's Natural Science Establishment Inc., P.O. Box 29212, Rochester, NY 14692-9012, (716) 359-2502.

Tableau D.1 Solutions nutritives mères pour le maintien de cultures mères d'algues

Solution nutritive mère	Composé	Quantité dissoute dans 500 mL d'eau désionisée
1	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	6,08 g
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,20 g
	H_3BO_3	92,8 mg
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	208,0 mg
	$ZnCl_2$	1,64 mg[a]
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	79,9 mg
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,714 mg[b]
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,63 mg[c]
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006 mg[d]
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,0 mg
2	$NaNO_3$	12,75 g
3	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,35 g
4	K_2HPO_4	0,522 g
5	$NaHCO_3$	7,50 g

a $ZnCl_2$ - Peser 164 mg et compléter à 100 mL. Ajouter 1 mL de cette solution à la solution mère n° 1.

b $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ - Peser 71,4 mg et compléter à 100 mL. Ajouter 1 mL de cette solution à la solution mère n° 1.

c $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ - Peser 36,6 mg et compléter à 10 mL. Ajouter 1 mL de cette solution à la solution mère n° 1.

d $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ - Peser 60,0 mg et compléter à 1 000 mL. Prendre 1 mL de cette solution et compléter à 10 mL. Prendre 1 mL de la deuxième solution et l'ajouter à la solution mère n° 1.

4. Si le filtrage est effectué au moyen d'un appareil stérile, le milieu filtré peut être utilisé immédiatement et aucune autre mesure de stérilisation n'est nécessaire avant son inoculation. Le milieu peut également être stérilisé à l'autoclave après avoir été déposé dans les contenants d'élevage.

5. Le milieu stérile inutilisé ne doit pas être stocké pendant plus d'une semaine avant d'être utilisé, en raison de la possibilité de pertes d'eau considérables par évaporation.

B. Création et maintien de cultures mères d'algues

1. Sur réception de la culture de lancement (généralement, environ 10 mL), on crée une culture mère en transférant aseptiquement 1 mL dans chacun de plusieurs flacons de culture de 250 mL renfermant 100 mL de milieu de culture

Tableau D.2 Concentration définitive de macronutriments et de micronutriments dans le milieu de culture

Macronutriment	Concentration (mg/L)	Élément	Concentration (mg/L)
$NaNO_3$	25,5	N	4,20
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12,2	Mg	2,90
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,41	Ca	1,20
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	14,7	S	1,91
K_2HPO_4	1,04	P	0,186
$NaHCO_3$	15,0	Na	11,0
		K	0,469
		C	2,14

Micronutriment	Concentration (µg/L)	Élément	Concentration (µg/L)
H_3BO_3	185	B	32,5
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	416	Mn	115
$ZnCl_2$	3,27	Zn	1,57
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,43	Co	0,354
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012	Cu	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,26	Mo	2,88
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	160	Fe	33,1
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	300	—	—

d'algues (préparé selon la description ci-dessus). Le reste de la culture de lancement peut être mis en réserve pour une durée pouvant atteindre six mois dans un réfrigérateur (dans l'obscurité) à 4 °C.

2. Les cultures mères sont utilisées comme sources d'algues pour lancer des cultures «alimentaires» (en vue des essais de toxicité sur *Ceriodaphnia*). Le volume des cultures mères maintenues à tout moment dépend de la quantité d'algues nécessaire pour l'élevage des daphnies et pour les essais. Il peut rapidement être porté à plusieurs litres, au besoin, à l'aide de bouteilles à sérum de 4 L ou de récipients analogues renfermant chacun 3 L de milieu de croissance.

3. La température de culture n'est pas critique. Les cultures mères peuvent être

maintenues à une température variant entre 20 et 25 °C dans des simulateurs d'environnement avec des cultures d'autres organismes si l'éclairage est suffisant (éclairement continu d'environ 4 300 lux, ou 400 pieds-bougies, à l'aide d'un fluorescent «blanc froid»).

4. Les cultures sont mélangées deux fois par jour, à la main.

5. Les cultures mères peuvent être conservées au réfrigérateur jusqu'à ce qu'elles soient utilisées pour lancer des cultures «alimentaires» ou peuvent être transférées dans un nouveau milieu à raison d'une fois par semaine. On transfère la culture mère d'algues âgée de sept jours, renfermant environ $1,5 \times 10^6$ cellules par millilitre, à raison de 1 à 3 mL par volume de 100 mL de milieu de culture frais. L'inoculum doit assurer une densité cellulaire initiale de l'ordre de 10 000 à 30 000 cellules par millilitre dans les nouvelles cultures mères; il faut prendre soin d'éviter la contamination par d'autres microorganismes.

6. On doit examiner les cultures mères chaque semaine au microscope, au moment du transfert, afin de repérer les cas de contamination microbienne. Les quantités en réserve d'organismes de culture peuvent être conservées pour une durée de 6 à 12 mois si elles sont gardées dans l'obscurité à 4 °C. Il est recommandé de préparer, tous les quatre à six mois, de nouvelles cultures mères à partir de cultures de lancement obtenues auprès de sources extérieures reconnues.

C. Création et maintien de cultures «alimentaires» d'algues

1. Les cultures «alimentaires» sont mises en route sept jours avant d'être utilisées dans les élevages de *Ceriodaphnia* ou dans les essais. On ajoute environ 20 mL d'une culture mère d'algues âgée de sept jours (*cf.* paragraphe précédent), renfermant $1,5 \times 10^6$ cellules par millilitre, à chaque litre de milieu de culture d'algues frais (p. ex., 3 L de milieu dans une bouteille de 4 L, ou 18 L dans une bouteille de 20 L). L'inoculum devrait assurer une densité cellulaire initiale de l'ordre de 30 000 cellules par millilitre. Des techniques aseptiques devraient être utilisées pour la préparation et le maintien des cultures; il faut prendre soin d'éviter la contamination par d'autres microorganismes.

2. Les cultures alimentaires peuvent être conservées à une température de 20 à 25 °C dans des simulateurs d'environnement avec les cultures mères d'algues ou des cultures d'autres organismes si l'éclairage est suffisant (éclairement continu d'environ 4 300 lux à l'aide d'un fluorescent «blanc froid»).

3. Les cultures sont mélangées en continu sur une plaque d'agitation magnétique (avec une barreau d'agitation de taille moyenne) ou dans un appareil à décantation modérément aéré; on peut également les mélanger deux fois par jour à la main. Il faut prendre soin d'éviter que la température des cultures n'augmente de plus de 2 à 3 °C*.

---

* Si les cultures sont déposées sur une plaque d'agitation magnétique, la chaleur dégagée par l'agitateur pourrait accroître leur température de plusieurs degrés.

D. Préparation d'un concentré d'algues pour l'alimentation de Ceriodaphnia

1. On prépare un concentré d'algues renfermant de 3,0 à 3,5 × 10^7 cellules par millilitre à partir des cultures alimentaires en centrifugeant les algues avec une centrifugeuse à plancton ou à godets ou en laissant les cultures décanter dans un réfrigérateur pendant un minimum de dix jours et un maximum de trois semaines et en siphonnant le surnageant.

2. La densité cellulaire (cellules par millilitre) du concentré se mesure à l'aide d'un compte-particules électronique, d'un microscope et d'un hémocytomètre, d'un fluoromètre ou d'un spectrophotomètre. On s'en sert pour établir la dilution (ou la concentration supplémentaire) nécessaire pour atteindre une densité cellulaire finale de 3,0 à 3,5 × 10^7 cellules par millilitre.

3. En supposant une densité cellulaire d'environ 1,5 × 10^6 cellules par millilitre dans les cultures alimentaires d'algues de sept jours et une récupération à 100 % au cours du processus de concentration, une culture de 3 L de sept à dix jours assurera une densité cellulaire de 4,5 × 10^9. Ce nombre de cellules fournira environ 150 mL de concentré cellulaire d'algues pour l'alimentation des élevages de *Ceriodaphnia* (1 500 portions de 0,1 mL). Cette quantité est suffisante pour quatre essais avec *Ceriodaphnia*.

4. Le concentré d'algues peut être conservé au réfrigérateur pendant un mois.

Annexe E

Série logarithmique de concentrations convenant aux essais de toxicité*

Colonne (nombre de concentrations comprises entre 100 et 10, ou entre 10 et 1)**						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

* Adapté de Rocchini *et al.* (1982).

** Une série de cinq concentrations ou plus peut être choisie dans une même colonne. Les points médians entre les concentrations de la colonne x se retrouvent dans la colonne $2x + 1$. Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées en pourcentage (volume ou poids), en mg/L ou en g/L. Au besoin, elles peuvent être multipliées ou divisées par n'importe quelle puissance de 10. On peut se servir de la colonne 1 lorsqu'on est très incertain quant au degré de toxicité. On ne devrait pas employer de concentrations plus espacées (c.-à-d. séparées par un facteur supérieur à 3,2). Pour les essais d'effluents, on gagne rarement beaucoup en précision en choisissant des concentrations dans une colonne à droite de la colonne 3; les écarts moins larges des colonnes 4 à 7 peuvent être utiles à l'occasion pour l'essai de substances chimiques ayant un seuil d'effet abrupt.

Annexe F

Analyse de la mortalité en vue de l'estimation de la concentration létale 50

L'essai sur trois couvées (7 ± 1 jours) pour mesurer la mortalité et la reproduction chez *Ceriodaphnia dubia* est un essai sensible de toxicité sublétale chronique. C'est pourquoi l'accent est normalement mis sur la détermination de la CSEO/CMEO ou de la CI_p (*cf.* 4.6). Cependant, il pourrait y avoir des circonstances où il serait préférable d'estimer la CL_{50} après une ou plusieurs durées d'exposition allant de 1 jour à 7 ± 1 jours; voici donc la marche à suivre à cette fin.

Afin d'évaluer la CL_{50}, on combine les données recueillies pour toutes les solutions de chaque concentration d'essai. Lorsque la mortalité n'est pas égale ou supérieure à 50 % dans au moins une concentration, il est impossible d'estimer la CL_{50}. Lorsque la mortalité est nulle à une certaine concentration, ce renseignement est appliqué à l'ajustement de la courbe de probit, cette valeur étant associée à un effet de 0 % de mortalité. Cependant, lorsque la mortalité est nulle dans une série de concentrations successives, une seule de ces valeurs devrait être utilisée pour l'évaluation de la CL_{50}; il s'agit du résultat associé à la plus forte concentration, c'est -à-dire celui qui est «le plus près du centre» de l'intervalle de distribution des données. De la même façon, s'il y avait une série de taux de mortalité de 100 % à des concentrations élevées dans un essai, une seule valeur correspondant à un effet de 100 % serait utilisée; une fois encore, ce serait celle qui est «le plus près du centre» de l'intervalle des valeurs, c'est-à-dire l'effet à la plus faible de ces concentrations. L'utilisation d'une seule valeur correspondant à 0 % et d'une seule valeur correspondant à 100 % d'effet s'applique à l'analyse des données par programme informatique ou par établissement manuel d'un graphique (*cf.* ci-après). L'utilisation de valeurs additionnelles de 0 % ou de 100 % pourrait fausser l'estimation de la CL_{50}.

On peut utiliser différents programmes informatiques pour calculer la CL_{50} et ses limites de confiance. Stephan (1977) a mis au point un programme de calcul de la CL_{50} qui fait appel à trois méthodes (des probits, de la moyenne mobile et binomiale) et l'a adapté aux ordinateurs personnels compatibles IBM. Ce programme en BASIC est recommandé; avec la permission de M. Charles E. Stephan (EPA, Duluth, MN), il est possible d'en obtenir une copie en envoyant une disquette à Environnement Canada (*cf.* annexe B). Un programme efficace d'analyse des probits sur micro-ordinateur est également offert par M. J.J. Hubert (1987); en outre, on peut utiliser d'autres méthodes manuelles et informatiques qui donnent des résultats satisfaisants (APHA *et al.*, 1989; EPA, 1989). Des programmes qui font appel à la méthode abrégée de Spearman-Karber (Hamilton *et al.*, 1977) sont disponibles pour les ordinateurs personnels, mais nous ne les recommandons pas puisque les personnes qui ne connaissent pas bien les incidences de l'écrêtement des données dose-effet pourraient obtenir des résultats divergents.

Le programme de C.E. Stephan (1977), que nous recommandons, fournit des estimations

de la CL_{50} et des limites de confiance selon chacune des trois méthodes qu'il utilise, pourvu que l'ensemble de données comprenne au moins deux cas où une partie des daphnies sont mortes. Avec des données uniformes ou régulières, les trois estimations seront sans doute semblables (*cf.* ci-après), et les valeurs fournies par l'analyse des probits devraient être préférées aux autres et consignées dans le procès-verbal de l'essai. L'estimation binomiale pourrait différer quelque peu des autres. Lorsqu'il n'y a pas, dans les résultats, deux cas où une partie des daphnies sont mortes, seule la méthode binomiale fonctionne; elle peut être appliquée à l'obtention de la meilleure estimation possible de la CL_{50}, avec des limites de confiance prudentes (larges).

Toute CL_{50} qui résulte de calculs informatiques devrait être vérifiée au moyen d'un graphique, sur échelle de probabilité logarithmique, du pourcentage de mortalité après un temps d'observation donné (p. ex., 96 h) aux différentes concentrations d'essai (APHA *et al.*, 1989; *cf.* exemple à la figure F.1). Tout écart important entre la CL_{50} estimée sur ce graphique et la valeur calculée par ordinateur doit être résolu.

Dans l'exemple théorique montré à la figure F.1, dix daphnies ont été exposées à chacune de cinq concentrations (1,8, 3,2, 5,6, 10 et 18 mg/L). Les pourcentages de mortalité correspondant aux nombres d'organismes morts (0, 2, 4, 9 et 10) ont été inscrits sur le graphique et on a tracé, à l'oeil, la droite de meilleur ajustement. On peut établir la concentration qu'on prévoit être létale pour 50 % des organismes en suivant la ligne pointillée à partir du niveau de 50 % jusqu'à son intersection avec la ligne ajustée, puis en passant à l'axe horizontal pour une estimation de la CL_{50}, soit 5,6 mg/L.

En traçant une droite comme celle de la figure F.1, on devrait attribuer relativement plus d'importance aux points qui sont proches de 50 % de mortalité. On peut se procurer du papier graphique de probabilité logarithmique («log-probit», comme à la figure F.1) dans toutes les bonnes librairies à vocation technique, ou en commander par leur entremise.

Les programmes informatiques ont donné des estimations très proches de celle fournie par le graphique de la figure F.1, établi à partir de données régulières. Les CL_{50} (et les limites de confiance à 95 %) étaient les suivantes :

Analyse des probits de Hubert (1987) :		5,56	(4,28 - 7,21)
Stephan (1977) :	probits	5,58	(4,24 - 7,37)
	moyenne mobile	5,58	(4,24 - 7,33)
	binomiale	6,22	(1,8 - 10)
Méthode de Spearman-Karber :	écrêtement 0 %	5,64	(4,38 - 7,26)
(Hamilton *et al.*, 1977)	écrêtement 10 %	5,73	(4,34 - 7,58)
	écrêtement 20 %	5,95	(4,34 - 9,80)

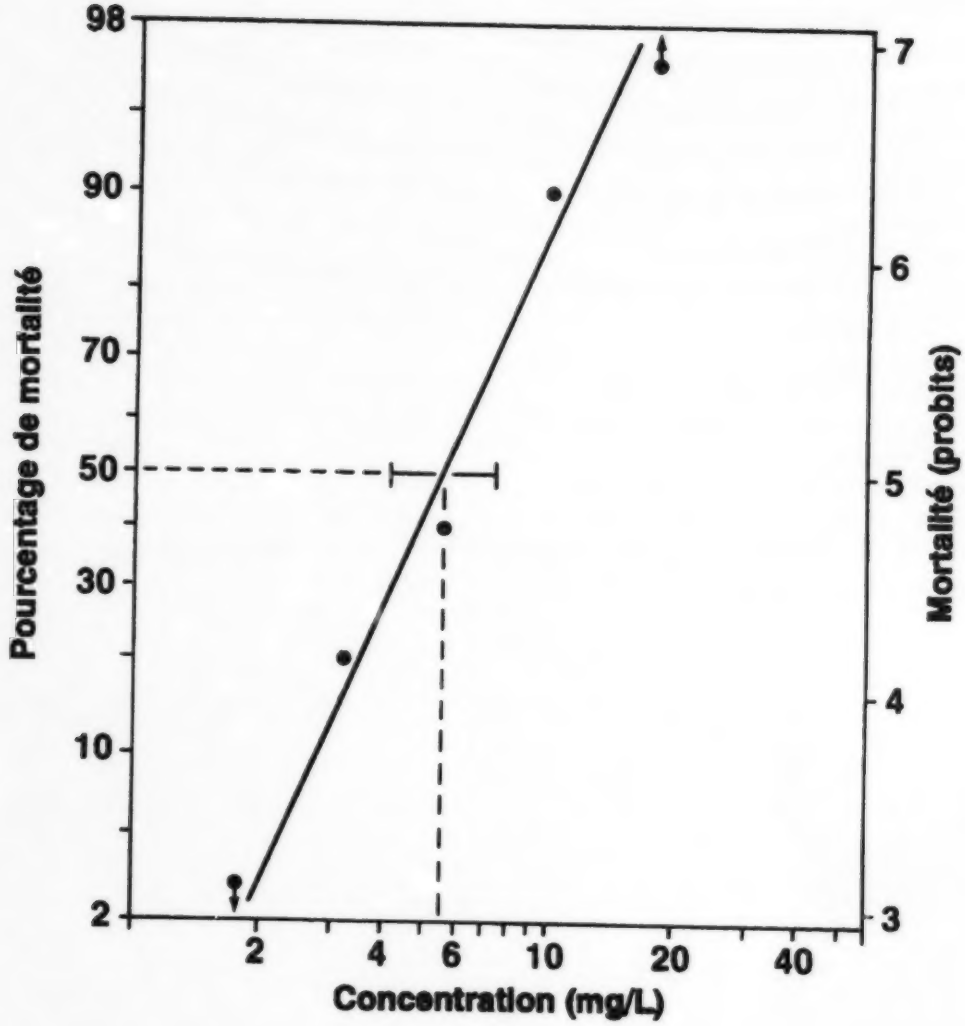


Figure F.1 **Estimation d'une concentration létale 50 par la représentation graphique de la mortalité sur papier de probabilité logarithmique**

La méthode binomiale n'a pas donné d'estimation des limites de confiance, mais elle a permis de choisir deux concentrations d'essai comme limites extrêmes d'un intervalle à l'intérieur duquel se trouveraient les vraies limites de confiance.

On peut aussi, si on le souhaite, estimer le temps létal 50 (TL_{50}) à une concentration donnée. Pour cela, on trace un graphique semblable à celui de la figure F.1 en portant le logarithme du temps sur l'axe horizontal. Les temps précis à la mort des organismes pourraient être utilisés, mais ils sont rarement connus puisque les solutions d'essai ne sont pas surveillées en permanence. Le pourcentage cumulatif de mortalité aux différentes inspections successives donne des résultats tout à fait satisfaisants pour l'établissement du graphique, et une droite ajustée à l'oeil permet d'estimer les limites de confiance lorsqu'on suit la démarche proposée dans Litchfield (1949). Lorsque les données le permettent, ces TL_{50} pourraient être estimés à partir de relevés successifs de la mortalité à intervalles de 24 h. La mortalité observée doit être supérieure à 50 % pour qu'on puisse estimer le TL_{50}.

Ni le TL_{50} ni le pourcentage de mortalité après de courts intervalles d'exposition ne constituent une méthode fiable pour établir la toxicité définitive; c'est pourquoi des comparaisons qui s'appuient sur ces résultats ne donnent que des indications semi-quantitatives. Toutefois, il pourrait parfois être utile d'indiquer si les substances soumises à l'essai ont un effet létal rapide ou lent. Ainsi, cela pourrait nous aider à établir si des dépassements de concentrations à court terme sont admissibles par rapport à une limite à long terme prévue dans un règlement. En principe, le fait d'établir un TL_{50} au lieu d'une CL_{50} peut conduire à une utilisation encore plus complète des résultats livrés par les essais, et une courbe de létalité qui prend le temps et la concentration comme paramètres pourrait se révéler utile pour l'examen des mécanismes d'effet des substances toxiques (Sprague, 1969; Suter *et al.*, 1987).